

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

GABRIELA KOZUCHOVSKI FERREIRA

**ENVOLVIMENTO DO METABOLISMO ENERGÉTICO,
FATOR NEUOTRÓFICO E ATIVIDADE DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE NO EFEITO DA L-TIROSINA
EM RATOS COM DIFERENTES FASES DE
DESENVOLVIMENTO**

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2014

GABRIELA KOZUCHOVSKI FERREIRA

**ENVOLVIMENTO DO METABOLISMO ENERGÉTICO,
FATOR NEUOTRÓFICO E ATIVIDADE DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE NO EFEITO DA L-TIROSINA
EM RATOS COM DIFERENTES FASES DE
DESENVOLVIMENTO**

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-graduação
em Ciências da Saúde como
requisito parcial para obtenção
do título de Doutora em
Ciências da Saúde.

Orientador: Emilio Luiz Streck
Coorientadora: Patrícia
Fernanda Schuck

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F383e Ferreira, Gabriela Kozuchovski.

Envolvimento do metabolismo energético, fator neurotrófico e atividade da enzima acetilcolinesterase no efeito da L-tirosina em ratos com diferentes fases de desenvolvimento / Gabriela Kozuchovski Ferreira ; orientador: Emílio Luiz Streck ; co-orientadora : Patrícia Fernanda Schuck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

95 p. : il.; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2014.

1. Medicamentos – Utilização. 2. Tirosinemia tipo II.
3. Ciclo de Krebs. 4. Fator neurotrófico derivado do
encéfalo 5. Acetilcolinesterase I Título

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

Folha Informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioenergética do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense e do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005


PARECER

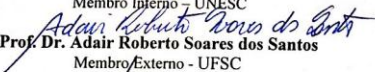
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Gabriela Kozuchovski Ferreira** sob o título “Envolvimento do metabolismo energético, fator neurotrófico e sistema colinérgico no efeito da L-Tirosina em ratos com diferentes fases de desenvolvimento” para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito A.

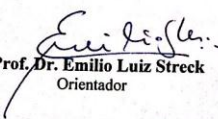
Criciúma, SC, 31 de janeiro de 2014.



Prof. Dr. Josiane Budni
Membro Relator - UNESC


Prof. Dr. Maria Inês da Rosa
Membro Interno - UNESC


Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Membro Externo - UFSC


Prof. Dr. Marcelo Farina
Membro Externo - UFSC


Prof. Dr. Emilio Luiz Strech
Orientador


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

*Dedico este
trabalho aos meus
pais que em
momentos difíceis
me fizeram seguir
em busca dos
meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

Agradeço à minha família, meus pais Everton e Ariadna que sempre me mostraram o melhor caminho a seguir e meu irmão Murilo pelos momentos de descontração e até mesmo pelos conselhos;

Agradeço a Gislaine por não ter medido esforços em sempre me ajudar quando necessário, bem como me passar todo seu conhecimento desde meu período de iniciação científica, é uma pessoa que tenho um carinho imenso;

Agradeço ao Edi pelo incentivo, pelo ombro amigo e me ajudar em momentos difíceis desta minha trajetória;

Agradeço a Cinara, Isabela, Camila, Thaís, Ândrea, Samira e Tamires pela amizade e ajuda no decorrer da minha trajetória;

Agradeço a Kizzy, Rafaela e Giselli pela parceria;

Agradeço as alunas de iniciação científica Júlia, Milena e Lara pela colaboração neste trabalho;

Agradeço todos meus amigos que me ajudaram indiretamente para que eu chegasse até aqui;

Agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pelos ensinamentos;

Agradeço ao meu orientador Emilio pelo meu crescimento pessoal e intelectual, pelas conversas, conselhos, e principalmente pela orientação;

Meu muito obrigada a todos!!!

...Nada aqui é certo
O que é certo mesmo, é que temos que viver
Cada momento
Cada segundo
Amando, sorrindo, chorando, emocionando, pensando, agindo,
querendo, conseguindo
E só assim
É possível chegar àquele momento do dia
Em que a gente diz:
"Graças a Deus deu tudo certo" ...
(Luís Fernando Veríssimo)

RESUMO

A tirosinemia tipo II é causada pela deficiência autossômica recessiva da enzima hepática tirosina aminotransferase. Consequentemente, altos níveis de tirosina são encontrados nos tecidos e fluidos fisiológicos de pacientes com tirosinemia tipo II e assim desenvolvem lesões cutâneas, sintomas oculares e/ou complicações neurológicas. Considerando que os mecanismos das disfunções neurológicas em pacientes com tirosinemia tipo II são pouco conhecidos, neste trabalho foi investigado a neurotoxicidade da L-tirosina sobre o metabolismo energético *in vitro* e *in vivo* em cérebro e fígado de ratos, bem como seu efeito sobre os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro de ratos. No experimento *in vitro*, ratos Wistar de 30 dias de idade sofreram eutanásia por decapitação e o cérebro e fígado foram dissecados. A L-tirosina (0.1; 1.0; 2.0 ou 4.0 mM) foi adicionada ao meio de reação enquanto grupo controle não foi adicionado L-tirosina, e a atividade das enzimas do metabolismo energético foram avaliados. No experimento *in vivo*, ratos Wistar (10 e 30 dias de idade) receberam uma única administração intraperitoneal de salina ou L-tirosina (500 mg/kg) e após 1 hora sofreram eutanásia por decapitação. A administração crônica consistiu em realizar administrações de salina ou L-tirosina (500 mg/kg) a cada 12 horas durante 21 dias, em ratos Wistar (7 dias de idade). Os animais sofreram eutanásia 12 horas após a última administração. Foi avaliado o metabolismo energético apenas após administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade. Os níveis de BDNF, expressão de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de *bdnf*, a atividade da AChE e expressão de mRNA de *ache* foram avaliadas após administração aguda de L-tirosina em ratos de 10 e 30 dias de idade e após administração crônica. Neste estudo, foi demonstrado que o efeito da L-tirosina *in vitro* inibiu a atividade da enzima citrato sintase no córtex cerebral e a enzima succinato desidrogenase foi aumentada no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado. A atividade do complexo I foi

inibida apenas no hipocampo, enquanto que a atividade do complexo II foi inibida no córtex cerebral, hipocampo e no fígado. A atividade do complexo IV foi diminuída no córtex cerebral. A administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade inibiu a enzima malato desidrogenase, citrato sintase e complexos II, II-III e IV em córtex cerebral e fígado. A atividade da succinato desidrogenase e complexo I foi inibida no córtex cerebral e aumentada no estriado. Os resultados dos níveis de BDNF mostraram que a administração aguda de L-tirosina diminuiu tanto os níveis de BDNF como mRNA de *bdnf* no estriado de ratos com 10 dias de idade. Nos ratos com 30 dias de idade, observamos uma diminuição dos níveis de BDNF sem modificações no nível de transcrição de BDNF no hipocampo e estriado. A administração crônica de L-tirosina aumentou os níveis de BDNF no estriado de ratos durante o seu crescimento, enquanto que a expressão de mRNA de *bdnf* não foi alterada. Por fim, observamos que a administração aguda em ratos de 10 e 30 dias de idade e administração crônica de L-tirosina aumentou a atividade da AChE em todas as áreas do cérebro avaliadas, quando comparados ao grupo controle. Além disso, houve uma diminuição significativa nos níveis de mRNA de *ache* no hipocampo após administração aguda de L-tirosina em ratos de 10 e 30 dias de idade e no estriado após administração crônica. Juntos, estes resultados mostram que alterações no metabolismo energético podem provocar anormalidades cerebrais, pelo déficit de ATP, e essas alterações muitas vezes podem estar envolvidas com a presença de estresse oxidativo. Desta forma sugerimos que a depleção da ATP pode estar associada com a diminuição dos níveis de BDNF e o aumento da atividade da AChE.

Palavras-Chave: Tirosinemia tipo II; Ciclo de Krebs; Cadeia respiratória mitocondrial; Fator neurotrófico derivado do cérebro; Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Tyrosinemia type II is caused by autosomal recessive deficiency of the hepatic enzyme tyrosine aminotransferase. Consequently, high levels of tyrosine are found in physiological fluids and tissues of patients with tyrosinemia type II and thus develop skin lesions, ocular symptoms and/or neurological complications. Whereas the mechanisms of neurological dysfunction in patients with tyrosinemia type II are unknown, this study was investigated the neurotoxicity of L- tyrosine on energy metabolism in vitro and in vivo in rat brain and liver, as well as its effect on the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in rat brain. In vitro, rats 30 days of age were killed by decapitation and the brain and liver were dissected. L- tyrosine (0.1, 1.0, 2.0 or 4.0 mM) were added to the reaction medium while the control group was not added L- tyrosine, and the activity of enzymes of energy metabolism were evaluated. Acute administration to Wistar rats (10 and 30 days old) received a single intraperitoneal administration of saline or L-tyrosine (500 mg/kg) and after 1 hour were killed by decapitation. Chronic administration consisted of performing general saline or L - tyrosine (500 mg/kg) every 12 hours for 21 days in rats (7 days old). The animals were killed 12 hours after the last administration. Energy metabolism has been reported only after the acute administration of L-tyrosine in rats, 30 days old. BDNF levels and expression of the messenger ribonucleic acid (mRNA) and BDNF expression and activity of AChE and mRNA *ache* were evaluated after acute administration of L-tyrosine in rats of 10 and 30 days of age and after chronic administration. In this study, it was demonstrated that the effect of L- tyrosine in vitro inhibited the enzyme activity of citrate synthase in the cerebral cortex and the enzyme succinate dehydrogenase was increased in the cerebral cortex, hippocampus, striatum and liver. The complex I activity was inhibited in the hippocampus, whereas the activity of complex II was inhibited in the cerebral cortex,

hippocampus and liver. The activity of complex IV was decreased in the cerebral cortex. Acute administration of L-tyrosine in rats 30 days inhibited the enzyme malate dehydrogenase, citrate synthase and complex II, III-III and IV in the cerebral cortex and liver. The activity of succinate dehydrogenase and complex I was inhibited in the cerebral cortex and increased in the striatum. The results of BDNF showed that acute administration of L-tyrosine decreased both BDNF and BDNF mRNA in the striatum of rats 10 days of age. In rats with 30 days of age, we observed a decrease in BDNF levels without changes in the level of transcription of BDNF in the hippocampus and striatum. The chronic administration of L-tyrosine increased BDNF levels in the striatum of rats during their growth, while BDNF mRNA expression was unchanged. Finally, we observed that acute administration in rats 10 and 30 days of age and chronic administration of L-tyrosine increased AChE activity in all brain areas evaluated, when compared to the control group. Furthermore, a significant reduction in AChE mRNA levels in the hippocampus after acute administration of L-tyrosine in rats of 10 and 30 days of age and striatum following chronic administration. Changes in energy metabolism can cause brain abnormalities, the deficit of ATP, and these changes can often be involved in oxidative stress. Thus we suggest that depletion of ATP may be associated with decreased levels of BDNF and increased AChE activity.

Key-words: Tyrosinemia type II, Krebs cycle; Mitochondrial respiratory chain; Brain-derived neurotrophic factor; Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da tirosina.....	17
Figura 2: Biossíntese de neurotransmissores, pigmentos e hormônios a partir da tirosina.....	18
Figura 3: Etapas do metabolismo da tirosina.....	19
Figura 4: Ciclo de Krebs e cadeia respiratória mitocondrial.....	28
Figura 5: Receptor de BDNF e suas vias de sinalização.....	32
Figura 6: Representação esquemática de uma sinapse colinérgica	35
Figura 7: Efeito <i>in vitro</i> da L-tirosina sobre atividade da enzima citrate sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade.....	48
Figura 8: Efeito <i>in vitro</i> de L-tirosina sobre atividade dos complexos I, II, II-III e IV no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade.....	49
Figura 9: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre atividade da enzima citrate sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade.....	51
Figura 10: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre atividade dos complexos I, II, II-III e IV no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade.....	52
Figura 11: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre os níveis de BDNF no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica de L-tirosina.....	54
Figura 12: Expressão do mRNA de <i>bdnf</i> no estriado de ratos com 10 dias de idade, e no hipocampo e estriado de ratos com 30 dias de idade após administração aguda de L-tirosina, e no estriado após administração crônica de L-tirosina.....	55
Figura 13: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre atividade da enzima AChE no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica de L-tirosina.....	57

Figura 14: Expressão do mRNA de <i>ache</i> no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 e 30 dias de idade após administração aguda de L-tirosina, e após administração crônica de L-tirosina.....	58
Figura 15: Representação esquemática dos resultados encontrados neste estudo.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo de resultados do efeito *in vitro* da L-tirosina sobre atividade das enzimas do metabolismo energético em cérebro e fígado de ratos com 30 dias de idade.....**50**

Tabela 2: Resumo de resultados do efeito *in vivo* da L-tirosina sobre atividade das enzimas do metabolismo energético em cérebro e fígado de ratos com 30 dias de idade.....**53**

Tabela 3: Resumo de resultados do efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre os níveis de BDNF e mRNA de *bdnf* em cérebro de ratos com diferentes idades.....**56**

Tabela 4: Resumo de resultados do efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre a atividade da AChE e os níveis de mRNA de *ache* em cérebro de ratos com diferentes idades.....**59**

LISTA DE ABREVIACÕES

4-HPP – Ácido 4-hidroxifenilpirúvico, do inglês *4-Hydroxy phenylpyruvic*

4-HPPD – 4-Hidrofenilpirúvico dioxigenase, do inglês *4-Hydroxy phenylpyruvic dioxigenase*

ACh – Acetilcolina, do inglês *Acetylcholine*

AChE – Acetilcolinesterase, do inglês *Acetylcholinesterase*

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico, do inglês *Cyclic adenosine monophosphate*

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato, do inglês *Adenosine triphosphate*

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*

BSA – Albumina de soro bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês *complementary Desoxyribonucleic acid*

CEUA – Comissão de ética em uso de animais

COBEA – Colégio brasileiro de experimentação animal

D.P. – Desvio padrão

DCIP – Dicloroindofenol

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Desoxyribonucleic acid*

DTNB – 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato)

ERK – Cinase regulada por sinal extracelular, do inglês *Extracellular signal-regulated kinase*

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FAA – Ácido fumarilcetoacético, do inglês *Acid fumarilcetoacético*

FADH₂ – dinucleotídio Flavina adenina, do inglês *Flavin adenine dinucleotide*

FAH – Fumarilacetoacetase hidrolase, do inglês *Fumarilacetoacetase hydrolase*

G1 – Monômeros

G2 – Dímeros

G4 – Tetrâmeros

GSH – Glutathiona reduzida
HGA – Ácido homogentísico, do inglês *Homogentisic acid*
M – Muscarínico
MAA – Ácido maleilacetoacético, do inglês *Maleilacetoacético acid*
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno, do inglês *Mitogen-activated protein kinase*
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *messenger Ribonucleic acid*
NADH – dinucleotidio Nicotinamida adenina, do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*
NGF – Fator neurotrófico de crescimento, do inglês *Neurotrophic growth factor*
NTBC – 2-(2-Nitro-4-trifluorometilbenzoi) -1,3-ciclohexanediona
ON – Óxido nítrico
PBS – Tampão fosfato-salino, do inglês *Phosphate buffered saline*
PCR – Reação de cadeia polimerase, do inglês *Polymerase chain reaction*
pH – Potencial hidrogeniônico
PI3-K – Fosfatidilinositol 3 cinase, do inglês *Phosphatidylinositol 3 kinase*
PKA – Proteína cinase A, do inglês *Protein kinase A*
PKC – Proteína cinase C, do inglês *Protein kinase C*
PLC – Fosfolipase, do inglês *Phospholipase*
PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*
RT-PCR – Transcriptase reversa de reação de cadeia polimerase, do inglês *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SNC – Sistema nervoso central
TAT – Tirosina aminotransferase, do inglês *Tyrosine aminotransferase*
TNB – Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico, do inglês *2-Nitro-5-thiobenzoic acid*
TrKB – Proteína tirosina quinase B, do inglês *Protein tyrosine kinase B*

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Tirosina.....	17
1.2 Hipertirosinemias.....	19
1.3 Tirosinemia Tipo II.....	22
1.3.1 Sintomas.....	23
1.3.2 Diagnóstico.....	25
1.3.3 Tratamento.....	26
1.4 Fisiopatologia.....	26
1.4.1 Metabolismo energético.....	27
1.4.2 Fator neurotrófico derivado do cérebro.....	29
1.4.3 Sistema Colinérgico.....	34
1.5 Justificativa.....	36
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Geral.....	38
2.2 Específicos.....	38
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	40
3.1 Animais experimentais.....	40
3.2 Experimento <i>in vitro</i>	40
3.3 Experimento <i>in vivo</i>	41
3.3.1 Administração aguda.....	41
3.3.2 Administração crônica.....	42
3.4 Análises Bioquímicas.....	42
3.4.1 Atividade das enzimas do ciclo de Krebs.....	43
3.4.2 Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.....	43
3.4.3 Avaliação dos níveis de BDNF.....	44
3.4.4 Avaliação da AChE.....	45
3.4.5 Desenho dos primers e análise semi-quantitativa de RT-PCR.....	45
3.4.6 Determinação da proteína.....	46
3.5 Análise Estatística.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Metabolismo energético <i>in vitro</i>	47
4.2 Metabolismo energético <i>in vivo</i>	51

4.3 Níveis de BDNF e mRNA <i>bdnf</i>	54
4.4 Atividade da AChE e mRNA de <i>ache</i>	57
5 DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÕES.....	71
7 PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 TIROSINA

A tirosina (do grego *tyros*, queijo, local de onde foi isolada pela primeira vez) pertence ao grupo dos aminoácidos condicionalmente essenciais e/ou semiessenciais, sendo obtida através da dieta, hidrólise tecidual ou hidroxilação da fenilalanina. Além disso, possui um radical aromático e é relativamente não-polar (Figura 1), por isso, é considerada um dos aminoácidos menos solúveis e forma cristais característicos quando se apresentam em altas concentrações (Scriver & Rosenberg, 1973). O seu grupo hidroxila pode formar pontes de hidrogênio, sendo um grupo funcional importante em algumas enzimas (Nelson & Cox, 2006).

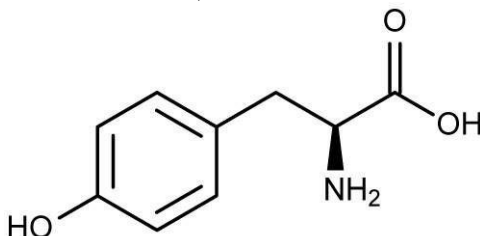


Figura1. Estrutura química da tirosina. Aminoácido com presença de radical aromático (Nelson e Cox 2006).

Tal como acontece com muitos aminoácidos, os níveis plasmáticos de tirosina aumenta após a ingestão de proteínas, mesmo sendo de forma moderada (Armstrong & Stave, 1973), e ocorre a diminuição do mesmo durante o estado não alimentado (Feigin et al., 1968). A tirosina está envolvida diretamente na biossíntese de catecolaminas, hormônios da tireóide e melanina (Figura 2), bem como apresenta dois principais destinos metabólicos: síntese protéica ou degradação em fumarato (intermediário do ciclo de krebs) e acetoacetato (corpo cetônico).

A catálise da tirosina ocorre no citoplasma dos hepatócitos e no epitélio do túbulo proximal do rim (Held, 2006).

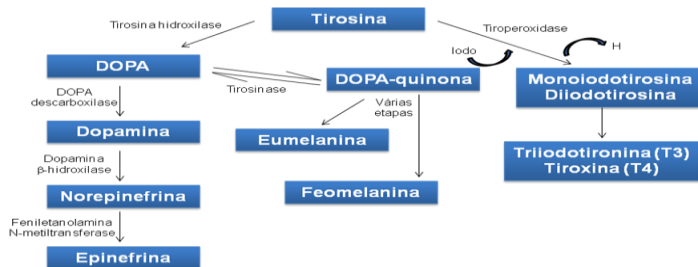


Figura 2: Biossíntese de neurotransmissores, pigmentos e hormônios a partir da tirosina. O aminoácido tirosina leva a formação da DOPA a partir da ação da enzima tirosina hidroxilase, que por sua vez leva a formação de dopamina pela DOPA descarboxilase, norepinefrina pela dopamina β-hidroxilase e epinefrina pela enzima feniletanolamina N-metiltransferase. A tirosina também pode levar a formação de DOPA-quinona através da DOPA que é catalisada pela enzima tirosinase e após várias etapas ocorre formação de eumelanina e feomelanina. Por fim, a tirosina pode levar também a formação de monoiodotirosina diiodotirosina pela ação da enzima tiroperoxidase, e então tem a formação dos hormônios da tireóide triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (Nelson & Cox, 2006).

A degradação da tirosina ocorre através de um processo de cinco passos. Inicialmente, a fenilalanina sofre ação da enzima fenilalanina hidroxilase, formando tirosina. Esta, sobre ação da tirosina aminotransferase (TAT) (EC 2.6.1.5), é transformada em ácido 4-hidroxifenilpirúvico (4-HPP), que é catalisado pela 4-HPP dioxigenase (4-HPPD), formando o ácido homogentísico (HGA). Este processo segue com o catabolismo do HGA pela HGA oxidase, formando ácido maleilacetoacético (MAA), e a degradação deste último pela MAA isomerase formando o ácido fumarilcetoacético (FAA). Por fim, o FAA é catabolizado pela fumarilcetoacetato hidrolase (FAH), originando o fumarato e o acetoacetato como produto final conforme figura 3 (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013).

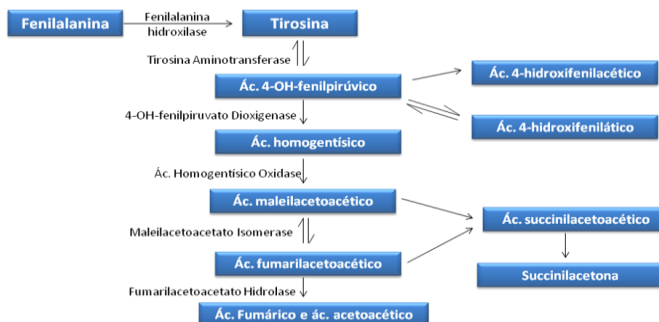


Figura 3: Etapas do metabolismo da tirosina. Fenilalanina sofre ação da enzima fenilalanina hidroxilase, formando tirosina. A tirosina pela ação da tirosina aminotransferase forma o ácido 4-OH-hidroxifenilpirúvico, que por sua vez é catalisado pela 4-OH-fenilpiruvato dioxigenase formando o ácido homogentísico. O ácido 4-OH-fenilpiruvato hidroxifenilpirúvico pode ter a formação do ácido 2-hidroxifenilacético e ácido 4-hidroxifenilático como via alternativa. O ácido homogentísico leva a formação do ácido maleilacetoacético pela ação do homogentísico oxidase, e a degradação deste último pela maleilacetoacetato isomerase forma o ácido fumarilacetoacético. O ácido maleilacetoacético e ácido fumarilacetoacético podem levar a formação do ácido succinilacetoacético e deste, ter a formação da succinilacetona. Por fim, o ácido fumarilacetoacético é catabolizado pela fumarilacetoacetato hidroxilase, originando o fumarato e o acetoacetato (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Sgaravatti et al., 2008).

1.2 HIPERTIROSINEMIAS

Em humanos, deficiências em quatro das cinco enzimas responsáveis pela degradação da tirosina foram identificadas: deficiência da FAH (tirosinemia tipo I) deficiência da TAT (tirosinemia tipo II), deficiência da 4-HPPD (tirosinemia tipo III), deficiência da HGA oxidase (alcaptonúria) e a tirosinemia transitória (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Held, 2006). Tanto as tirosinemias tipo I, II e III quanto a

alcaptonúria e tirosinemia transitória provocam o acúmulo de tirosina nos tecidos e fluidos fisiológicos dos indivíduos afetados. A hipertirosinemia também pode ocorrer em outras situações incluindo o fígado imaturo de recém-nascidos prematuros e doença hepática. No entanto, a baixa atividade da enzima TAT é presente no fígado de recém-nascido (Mitchell et al., 2001, 2013).

Tirosinemia tipo I ou hepatorenal ocorre a partir da mutação do gene FAH e atingem de 1/100.000 para 1/120.000 pessoas. Pacientes com esta doença apresentam uma variedade de sintomas clínicos, como dano no fígado, na infância (que pode avançar para cirrose), redução dos fatores de coagulação, hipoglicemia, altas concentrações de metionina e fenilalanina no plasma, alto risco de carcinoma hepatocelular e disfunção no glomérulo renal e tubular (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013). O tratamento da tirosinemia tipo I é inicialmente baseado em dieta com restrição de proteínas animais e vegetais (fontes da tirosina). Dentre a terapia farmacológica encontra-se o 2-(2-Nitro-4-trifluorometilbenzoi) -1,3-ciclohexanediona (NTBC) que inibi a enzima 4-HPPD, prevenindo o acúmulo de succinilacetoacetato e mantendo o elevado nível de tirosina no sangue e órgãos (Schlump et al., 2008). Outra possibilidade terapêutica é o transplante hepático (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013).

A tirosinemia tipo II ocorre devido mutação no gene TAT. A incidência é menor que 1 em 250.000. Alterações nos olhos, pele e sintomas neurológicos são encontradas na doença (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Held, 2006). As concentrações plasmáticas de tirosina variam entre 370 a 3420 μM em pacientes não tratados enquanto que as concentrações normais são inferiores a 103 μM (Goldsmith et al., 1973; Rabinowitz et al., 1995; Macsai et al., 2001; Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Valikhani et al., 2005; Held, 2006). O tratamento consiste somente em restrição dietética de tirosina e fenilalanina (Sayar et al., 1988).

Tirosinemia tipo III possui poucos casos descritos, sendo que ocorre devido à mutação no gene 4-HPPD. Os pacientes normalmente apresentam problemas neurológicos e ataxia,

podendo ser detectado precocemente. É caracterizado pela presença de altos níveis de tirosina plasmática com taxa de 355 a 640 μM (Giardini et al., 1983). Um dos tratamentos é realizado com dieta restrita em proteínas. Além disso, o ácido ascórbico também pode ser uma alternativa terapêutica que impede que a enzima 4-HPPD seja inibida pelo seu substrato (Menkes et al., 1972) e por ser um co-substrato da monoxigenase que faz a oxidação da fenilalanina para tirosina (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013).

Alcaptonúria é causada pela deficiência da HGA oxidase e a incidência é de 1 em 250.000 pessoas, embora em algumas áreas, como a Eslováquia e República Dominicana sua incidência é mais comum (Phornphutkul et al., 2002). Ainda não possui tratamento eficaz para esta doença. Dentre as três características principais da alcaptonúria encontram-se a urina escura após a exposição ao ar (resultado da oxidação de HGA), ocronose (pigmentação preta azulada dos tecidos conjuntivos), sendo que outros efeitos da ocronose incluem cálculos (renal, próstata, vesícula biliar e salivar), rupturas (muscular, tendões e ligamentos), osteopenia e por fim artrite da coluna e das articulações diartrodiais (Gilbert, 1987; Gainess, 1989).

A tirosinemia transitória é resultado da combinação de 4-HPPD imaturo com elevada ingestão de fenilalanina e tirosina, e deficiência de ácido ascórbico (Scriver e Rosenberg, 1973). Isto é causado por um desequilíbrio entre a taxa do catabolismo de tirosina e atividade da 4-HPPD, com atraso na maturação do feto e recém-nascido. O motivo que leva a ser particularmente frequente em recém-nascidos é a ingesta maior na quantidade de tirosina e reduzida de ácido ascórbico (Wong et al., 1967). A incidência é entre 0,5 - 10% em recém-nascidos vivos e a idade de início nas primeiras duas a quatro semanas de vida, a maior parte das crianças é assintomática por responder a administração de ácido ascórbico ou com uma dieta restrita de fenilalanina e tirosina (Wong et al., 1967).

1.3 TIROSINEMIA TIPO II

A tirosinemia tipo II, também denominada tirosinemia oculocutânea ou síndrome de Richner-Hanhart (OMIM 276600), foi descrita pela primeira vez por Richner, um suíço oftálmico, em 1938 (Richner, 1938), e depois descrito por Hanhart, um suíço geneticista, em 1947 (Hanhart, 1947). Porém somente no início de 1970 foi relacionado às descrições dos sintomas apresentado por indivíduos com deficiência no metabolismo de tirosina (Goldsmith et al., 1973). Esta doença parece estar associada à consanguinidade e devido a isso é comum entre as populações da Itália, Alemanha, França, Suíça, Espanha, Canadá, Austrália, por possuir uma grande quantidade de consanguinidade. Sabe-se que metade dos casos de tirosinemia tipo II é de ascendência italiana e até 2010 menos de 150 casos foram relatados em indivíduos com tirosinemia tipo II em diferentes populações (Goldsmith, 1983; Colditz et al., 1984; Goldsmith, 1989; Chitayat et al., 1992).

A tirosinemia tipo II é causada pela deficiência autossômica recessiva da enzima hepática TAT, sendo que a TAT está localizado no cromossomo 16 (q22.1-22.3) (Natt et al., 1987), possui 10,9 kb e contém 12 exons. O ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) da *tat* codifica 454 resíduos de aminoácidos sendo previsto um peso molecular de 50,4 kDa. As mutações no gene TAT foram identificadas como causa da tirosinemia tipo II, e até o ano de 2013 foram encontrado 15 mutações diferentes na região de codificação do gene TAT (Mitchell et al., 2013). As mutações estão distribuídas por todo o gene e podem acontecer em diferentes exons levando a perda parcial ou total da enzima, que por sua vez vai configurar o fenótipo da doença, podendo ser moderada ou severa (Charfeddine et al., 2006; Legarda et al., 2011). A maioria das mutações foi encontrada no exon 12 induzindo uma menor interação entre os aminoácidos e impedindo que formem pontes de hidrogênio ou promovendo uma desestabilização estrutural do gene (Charfeddine et al., 2006). Contudo as mutações no exon 7 e 9 não foram ainda descritas (Huhn et al., 1998; Charfeddine et al., 2006; Meissner et al., 2008).

Em ratos, a quantidade da enzima TAT é detectável somente no final da gestação (Coufalik e Monder, 1978), sendo que a atividade da enzima aumenta rapidamente depois do nascimento em um pico de 12 horas, duas vezes maior que os níveis apresentado em ratos adultos, e após 2 dias do nascimento esses níveis diminuem (Granner e Hargrove, 1983). Em humanos, os valores do TAT também são baixos no período neonatal (Ohisalo et al., 1982). Uma vez que a expressão de TAT é estritamente limitada no citoplasma dos hepatócitos (Hargrove e Mackin, 1984), a sua atividade é um marcador útil de diferenciação hepatocelular. A TAT é considerada uma enzima determinante da velocidade do catabolismo da tirosina, por apresentar uma meia-vida curta (2-3 horas) e assim permitir rápidas flutuações da atividade em resposta a estímulos alimentares (Hargrove et al., 1989).

Os níveis plasmáticos de tirosina presente nesta tirosinemia são maiores que em outras tirosinemias. Consequentemente, altos níveis de tirosina são encontrados nos tecidos e fluidos fisiológicos desses pacientes com tirosinemia tipo II (Macsai et al., 2001). A elevada excreção urinária de tirosina e seus metabólitos (4-HPP, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilático, N-acetiltirosina e 4-tiramina) também caracterizam a tirosinemia tipo II (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013).

1.3.1 Sintomas

A hipertirosinemia é associada com danos neurológicos em vários pacientes com deficiência da TAT, e com menos frequência naqueles que possuem deficiência da 4-HPPD ou hipertirosinemia transitória (Light et al., 1973; Mamunes et al., 1976; Rice et al., 1989). Os sintomas na tirosinemia tipo II aparecem logo após o nascimento, e incluem lesões cutâneas (85 % dos casos), sintomas oculares (75 % dos casos) ou complicações neurológicas (60 % dos casos), ou até mesmo a combinação de todos os sintomas (Goldsmith et al., 1989).

A patogênese das lesões oculares e cutâneas na tirosinemia tipo II está relacionada com a formação de cristais intracelulares de tirosina (Scriver e Rosenberg, 1973). As lesões oculares caracterizam-se por fotofobia, lacrimejamento, vermelhidão e dores intensas. Conjuntivites e ulcerações na córnea, que podem causar um prejuízo na visão, também são frequentemente observadas nesses pacientes. As lesões cutâneas caracterizam-se por apresentarem manchas escuras pelo corpo, em função ao aumento da produção de melanina pelas altas concentrações de tirosina. Além disso, podem apresentar hiperkeratoses delimitadas, dolorosas e não pruriginosas em região palmar e/ou plantar, frequentemente associadas à hiperidrose. Nas mãos, geralmente ocorrem nas polpas digitais, eminências tenar e hipotenar, enquanto as plantares se localizam nas áreas de apoio de maior pressão. Acredita-se que a fisiopatologia seja semelhante à lesão corneana, com depósitos de cristais de tirosina no citoplasma dos queratinócitos, levando a ruptura e fusão destas células (Goldsmith, 2005). Macsai e colaboradores (2001) relataram que os principais sinais de danos oculares da tirosinemia tipo II ocorrem antes do desenvolvimento de lesões de pele enquanto em outros casos as manifestações oftalmológicas podem aparecer somente aos quarenta anos de vida (Chitayat et al., 1992).

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) é variável, sendo que pode ocorrer retardo mental grave associado com microcefalia, tremor, ataxia, distúrbios na coordenação motora, déficit de linguagem e convulsões. Não há nenhuma relação entre a idade de diagnóstico e retardo mental. No entanto, o grau de atraso mental pode estar relacionada com o nível de tirosina no plasma (Fois et al., 1986), sendo assim provavelmente, os altos níveis plasmáticos de tirosina são os responsáveis pelo comprometimento do SNC na tirosinemia tipo II (Mitchell et al., 1995, 2001, 2013; Held, 2006).

1.3.2 Diagnóstico

A etiologia é multifatorial já que diferentes condições hereditárias e adquiridas podem causar hipertirosinemia. A maioria pode ser diagnosticada através da história clínica, exame físico e exames laboratoriais disponíveis. Em geral, os breves períodos de hipertirosinemia são bem tolerados em seres humanos e mamíferos. No entanto, a hipertirosinemia crônica está associada com danos neurológicos e de desenvolvimento em vários pacientes com deficiência de TAT e alguns com deficiência 4-HPPD e hipertirosinemia transitória (Light et al., 1973; Mamunes et al., 1976; Rice et al., 1989).

Em ratos, o alto consumo de tirosina tem sido associado com o desenvolvimento de ceratite exsudativa (Martin e Herper, 1942; Lock et al., 1996) sugerindo que os sinais da tirosinemia oculocutâneo podem estar diretamente relacionados com o aumento dos níveis teciduais da tirosina. Atualmente são realizados exames de triagem ("triagem neonatal para EIM", ou o Teste do Pezinho) nos primeiros dias de vida da criança. No Brasil, o diagnóstico das tirosinemias faz parte do teste de triagem neonatal expandido, conhecido como Teste do Pezinho e o acesso a esse teste é somente através de laboratórios particulares, não sendo oferecido pelo Sistema Único de Saúde.

Métodos quantitativos são mais adequados para diagnóstico dos diferentes tipos de tirosinemias. Por exemplo, a espectrometria de massa em sequência, baseia-se na detecção quantitativa fidedigna dos níveis de fenilalanina e tirosina, bem como da razão tirosina/fenilalanina, em um pequeno volume de sangue/plasma que fornece uma taxa relativamente baixa de falso-positivos e pode ser útil na detecção simultânea de metabólitos envolvidos em outras doenças hereditárias (Chace et al., 1998; Blau et al., 2011). Outra forma de confirmação da doença é pela avaliação da atividade enzimática em biópsia hepática, e análise de mutações no gene da *tat* (Mitchell et al., 1995; Mitchell et al., 2001, 2013; Held, 2006).

O nível de fenilalanina na tirosinemia tipo II é normal e os metabólitos da tirosina excretados na urina por pacientes

incluem 4-HPP, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilático, N-acetiltirosina e 4-tiramina. Esses compostos são metabólitos da tirosina produzidos por vias metabólicas acessórias na deficiência da TAT e é considerado um fator determinante para o diagnóstico da doença (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013).

1.3.3 Tratamento

O tratamento bem sucedido é aquele em que o diagnóstico é precoce e normalmente é realizado através de estratégias terapêuticas isoladas ou combinadas, da seguinte forma: limitando a entrada do precursor, suplementando o metabólito ausente ou a enzima deficiente, inibindo a formação da substância acumulada ou controlando fatores desencadeantes (Fraser et al., 1987). O tratamento da tirosinemia tipo II consiste na restrição nutricional de fenilalanina e tirosina, para amenizar as lesões oculares e cutâneas dos pacientes com tirosinemia tipo II. Entretanto, ainda não foi estabelecido o nível ideal de tirosina no sangue, nem mesmo a idade que a dieta deve ser iniciada para evitar comprometimento neurológico (Fraser et al., 1987; Sayar et al., 1988).

As lesões nos olhos e pele melhoram após poucas semanas de terapia dietética, porém ocorre a reincidência com a interrupção da dieta. Retinóides também podem melhorar as lesões na pele sem mudanças no nível de tirosina e o tratamento para lesões nos olhos é realizado com utilização de esteróides sistêmicos (Sayar et al., 1988).

1.4 FISIOPATOLOGIA

Embora não se saiba o exato mecanismo fisiopatológico dos sintomas neurológicos e, além disso, os danos cerebrais dos pacientes com esta doença é desconhecido, estudos têm sugerido que os altos níveis plasmáticos de tirosina são os responsáveis

pelo comprometimento do SNC na tirosinemia tipo II (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Held, 2006). Acreditamos que o metabolismo energético, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e enzima acetilcolinesterase (AChE) estão envolvidos na fisiopatologia da tirosinemia tipo II.

1.4.1 Metabolismo Energético

O adenosina trifosfato (ATP) é o principal combustível da célula na maioria dos processos que necessitam de energia (Lehninger et al., 2007). O cérebro desenvolve uma intensa atividade metabólica, porém possui uma pequena reserva energética em relação ao grande consumo de glicose, existindo assim uma necessidade contínua de substratos energéticos (Dickinson, 1996). A mitocôndria é a organela responsável pelos processos de respiração celular e obtenção de energia na forma de ATP. Na matriz mitocondrial, existem as enzimas envolvidas no ciclo de Krebs, onde se destaca a citrato sintase. Esta enzima dá início ao ciclo e é considerada como marcadora de metabolismo mitocondrial (Marco et al., 1974). A citrato sintase também catalisa a condensação do oxaloacetato ao grupo acetil da acetil coenzima-A (Shepherd & Garland, 1969). Além disso, a malato desidrogenase e a succinato desidrogenase, também fazem parte do ciclo de Krebs. A malato desidrogenase catalisa a desidrogenação de L-malato em oxaloacetato na etapa final do ciclo de Krebs (Kelly et al., 1989) e a succinato desidrogenase é um dos marcadores mais confiáveis de capacidade mitocondrial para fornecer uma quantidade adequada de ATP, uma vez que faz parte tanto do ciclo de Krebs quanto da cadeia respiratória (complexo II) (Tyler, 1992).

Na membrana interna da mitocôndria estão localizados os complexos enzimáticos envolvidos no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (Devlin & Michelacci, 2003). A ligação íntima entre o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa é responsável pela maior parte da produção de ATP gerada pelos seres humanos, sendo que a cadeia de transporte de elétrons é

composta por quatro complexos enzimáticos (complexos I, II, III e IV) e dois componentes que não fazem parte dos complexos, a coenzima Q, que transporta elétrons dos complexos I e II ao complexo III, e o citocromo c, que transporta elétrons do complexo III ao complexo IV. Os elétrons presentes nas coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH_2) provenientes do ciclo de Krebs são transferidos para os complexos I e II, respectivamente, do complexo I e II para coenzima Q, depois para o complexo III, citocromo c, complexo IV e finalmente para o oxigênio (Navarro & Boveris, 2007), conforme demonstrado na figura 4.

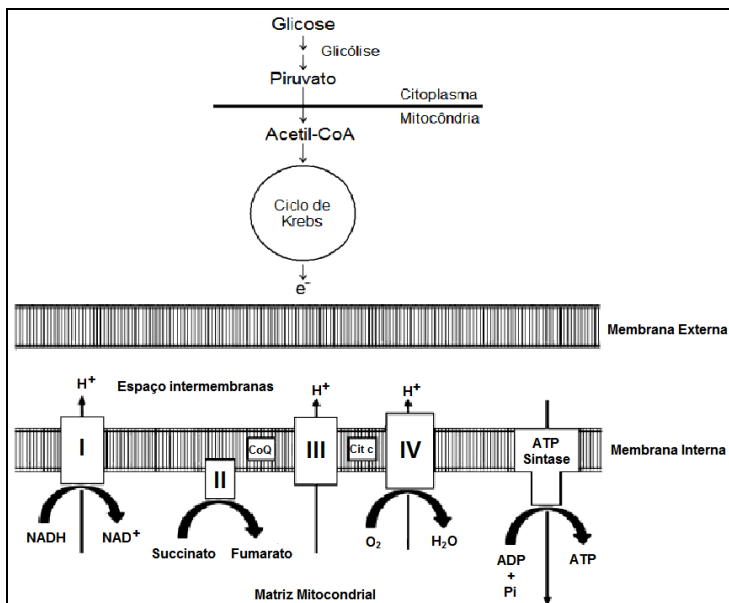


Figura 4: Ciclo de Krebs e cadeia respiratória mitocondrial. A glicose passa por diversas reações na glicólise levando a formação de piruvato no citoplasma das células. O piruvato leva a formação de acetil-CoA na mitocôndria, e este por sua vez entra no ciclo de Krebs. Através do ciclo de Krebs tem a liberação de elétrons, que entram na cadeia respiratória mitocondrial para a formação de ATP. Os elétrons presentes

nas coenzimas NADH e FADH_2 provenientes do ciclo de Krebs são transferidos para os complexos I e II, respectivamente, do complexo I e II para coenzima Q, depois para o complexo III, citocromo c, complexo IV e finalmente para o oxigênio. Por fim, na bomba ATP sintase tem a formação de ATP a partir da fosforilação do ADP (Adaptado de Rezin et al., 2008; Navarro & Boveris, 2007).

Estudo *in vitro* e *in vivo* apontam para um efeito inibitório da tirosina sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial e citosólica, e a adição de glutatona reduzida (GSH) ao ensaio foi capaz de prevenir tal inibição (de Andrade et al., 2011). Outros resultados *in vitro* demonstraram que a tirosina inibiu a atividade da piruvato quinase em córtex cerebral de ratos, e a GSH preveniu tal inibição (de Andrade et al., 2012). O mesmo estudo relatou que a administração aguda de L-tirosina metil éster inibiu a atividade da piruvato quinase e da creatina quinase mitocondrial e citosólica, e o pré-tratamento com creatina impediu a inibição dessas enzimas (de Andrade et al., 2012).

Um recente estudo realizado por Ramos e colaboradores (2013) demonstrou que a administração aguda de L-tirosina em ratos com 10 dias de idade inibiu a atividade da enzima citrato sintase no estriado e aumentou a atividade da malato desidrogenase e succinato desidrogenase no hipocampo. Por outro lado, estas enzimas não foram afetadas no córtex cerebral. Este estudo também demonstrou que a atividade dos complexos I e II foi inibida pela administração aguda de L-tirosina no estriado. Por outro lado, houve um aumento da atividade do complexo II-III no hipocampo e a atividade do complexo IV não foi afetada pela administração aguda de L-tirosina em ratos com 10 dias de idade.

Dados ainda não publicados pelo nosso grupo demonstraram que a administração crônica de L-tirosina em ratos em desenvolvimento inibiu a atividade da enzima citrato sintase e succinato desidrogenase no hipocampo e estriado de ratos, porém a atividade da malato desidrogenase foi aumentada somente no estriado. Os complexos I e II-III foram diminuídos no estriado após administração crônica de L-tirosina e a atividade do

complexo IV foi aumentado no hipocampo e reduzido no estriado de ratos em desenvolvimento. Desta forma foi visto que a administração crônica de L-tirosina causa alterações no metabolismo energético no hipocampo e estriado de ratos, e que estas alterações são semelhantes no cérebro de ratos com 10 dias de idade. Isso sugere que L-tirosina em determinadas fases do desenvolvimento cerebral pode ser crucial para o desenvolvimento dos sintomas graves em pacientes tirosinêmicos.

Horn e Barrientos (2008) mostram que a disfunção mitocondrial resulta de uma falha no funcionamento da cascata bioquímica, sugerindo ser um importante fator na patogênese de muitas doenças. Além disso, uma anormalidade no metabolismo energético pode desencadear lesão e morte celular (Heales et al., 1999; Blass, 2001; Calabrese et al., 2001; Schurr, 2002). Portanto, alterações nas enzimas do metabolismo energético podem participar da fisiopatologia da tirosinemia tipo II.

1.4.2 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

O BDNF foi descoberto em 1982, como a segunda de uma família de moléculas com atividade neurotrófica, cuja primeira a ser identificada foi o fator de crescimento neurotrófico (NGF) (Barde et al., 1982). O BDNF é produzido principalmente pela glia e também pelo núcleo dos neurônios e possui grande expressão no hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo (Shimizu et al., 2003). Também é responsável pela modulação de diversas funções sinápticas, induzindo estímulo à maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal.

Lessmann e colaboradores (2003) demonstraram que a molécula de BDNF é sintetizada primeiramente na forma de pré-pró-BDNF e o mRNA do *bdnf* direciona a síntese da proteína nascente para o retículo endoplasmático, de onde seguirá para a via secretora. A proteína nascente é clivada no retículo endoplasmático dando origem a pró-BDNF, e, de acordo com Chen e colaboradores (2006), o pró-BDNF será envolto pelo

complexo de Golgi e empacotado em vesículas secretoras para liberação espontânea ou por estímulo. O pró-BDNF secretado por neurônios (substância nigra, amígdala, hipotálamo, cerebelo e córtex cerebral) e células de Schwann é posteriormente convertido a BDNF maduro por proteases extracelulares (Pang et al., 2004).

Os efeitos biológicos do BDNF são mediados principalmente pelo seu receptor de alta afinidade, o receptor Trk B (Chen e Weber, 2004), promovendo uma cascata de sinalização intracelular e de transcrição em vários sistemas neuroquímicos, tais como proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol 3 cinase (PI3-K) e fosfolipase (PLC) (Reichardt, 2006). As vias de sinalização do BDNF são ativadas principalmente por uma sequência de fosforilações via cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) e Akt, conforme figura 5.

Figura 5: Receptor de BDNF e suas vias de sinalização. BDNF é mediado principalmente pelo receptor Trk B que ativa SHC levando ao recrutamento de um complexo de adaptadores como GRB2 e fator SOS estimulando a Ras, que por sua vez ativa PI3K, MEK e Raf/ERK. O PI3K também pode ser ativado por proteínas adaptadoras via sistema nervoso central, GRB2 e GAB1. O GRB2 quando fosforilado proporciona o encaixe da GAB1 que é vinculado ao PI3K (Reichardt, 2006). RSK e MEK fosforila CREB e outros fatores de transcrição. RSK e Akt fosforila BAD e assim promove sua inativação. Quando BAD é

fosforilado pode prevenir a associação com mitocôndrias localizadas BCL-XL e BCL2. Desta forma Akt leva a sobrevivência celular, diferenciação, plasticidade sináptica e neogênese. BAD leva a sobrevivência celular (Adaptado de Wong, 2013; Chen e Weber, 2004).

O BDNF parece induzir efeitos neurotróficos e neuroprotetores a longo prazo (Murer et al., 2001). Este fator trófico tem a capacidade de regular diversas funções biológicas, tais como crescimento axonal e conectividade, apoptose e mediação do processo de sobrevivência de neurônios, incluindo neurônios colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, hipocampus e corticais (Alderson et al., 1990; Hyman et al., 1991; Gosh et al., 1994; Lindholm et al., 1996; Rumajogee et al., 2004), além de participar na resposta local a diversos estressores neuronais e ambientais (Qian et al., 2007). É essencial para a plasticidade neuronal (Tyler et al., 2002), mecanismo importante para os processos de aprendizagem e memória (Barboza, 2009).

Ferreira e colaboradores (2013) demonstraram que os níveis de NGF foram diminuídos no estriado de ratos com 10 dias de idade, bem como no hipocampo e córtex cerebral após administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade. Contudo, a administração crônica de L-tirosina ocasionou um aumento nos níveis de NGF no córtex cerebral de ratos. Wu e colaboradores (1996) demonstraram que a depleção de ATP pode ser um dos fatores que leva a diminuição dos níveis de neurotrofinas, acompanhado por estresse oxidativo.

Alteração na expressão ou função do BDNF, considerando uma das principais neurotrofinas do cérebro, pode levar não somente a disfunção no desenvolvimento neural, mas também nos déficits da migração, conexões, e uma alteração na plasticidade cerebral e anormalidade estrutural (Murakami et al., 2005). Tais considerações conduzem à hipótese de que reduções nos níveis de BDNF podem estar alteradas na tirosinemia tipo II.

1.4.3 Sistema Colinérgico

A acetilcolina (ACh) foi inicialmente descrita como sendo um mediador da função celular e que estimulava o nervo parassimpático. A partir disso, foi descrito, purificado e determinado o receptor nicotínico, sendo até hoje descritos muitos subtipos desse receptor, além da estrutura das colinesterases e transportadores (Taylor e Brown, 1994). Sabe-se também que além da ação neurotransmissora, a ACh possui também uma função moduladora, pois regula a ação de outros neurotransmissores no SNC (Taylor e Brown, 1994).

A ACh é um neurotransmissor excitatório que atua na junção neuromuscular de neurônios pós-sinápticos e músculos esqueléticos (Lehninger et al., 2007). A ACh é sintetizada no neurônio pré-sináptico a partir de colina e acetil-coenzima A pela enzima colina acetiltransferase, posteriormente é armazenada em vesículas via um transportador vesicular de ACh. Uma vez que ocorre um estímulo, as vesículas liberem ACh na fenda sináptica, e esta é rapidamente degradada em íon acetato e colina pela enzima AChE, a qual se encontra em tetrâmeros ancorados a membrana plasmática ou como monômeros solubilizados na fenda (Soreq e Seiman, 2001). Liberada na fenda a ACh pode ativar dois tipos de receptores: nicotínicos ou muscarínicos (M) (Purves et al., 2001). Os receptores nicotínicos são receptores ionotrópicos localizados, no SNC, principalmente nos neurônios pré-sinápticos onde modulam a liberação do neurotransmissor (Gotti et al., 2006), e estudos recentes demonstram que agonistas destes podem promover melhora na memória de reconhecimento e de trabalho (Boess et al., 2007). Já os receptores muscarínicos são divididos em cinco tipos (M1-M5), e são os principais receptores mediadores dos estímulos colinérgicos, modulando vários canais iônicos e a excitabilidade neuronal. Dentre os cinco subtipos de receptores, o M1 parece possuir papel chave no processo de aprendizado e memória (figura 6), promovendo a potenciação de longa duração e a plasticidade sináptica no hipocampo (Shinoe et al., 2005).

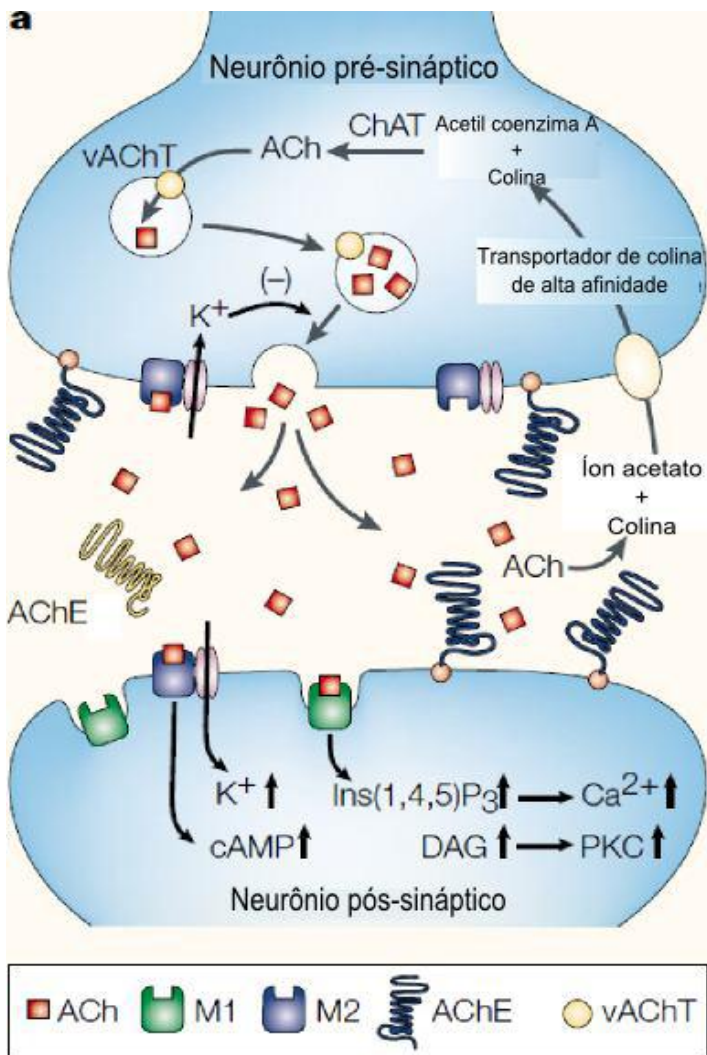


Figura 6: Representação esquemática de uma sinapse colinérgica. ACh é sintetizada no neurônio pré-sináptico a partir de colina e acetil-coenzima A pela enzima colina acetiltransferase, posteriormente é armazenada em vesículas via um transportador vesicular de ACh. O estímulo e as vesículas liberem ACh na fenda sináptica, esta é

rapidamente degradada num íon acetato e colina pela enzima AChE, a qual se encontra em tetrâmeros ancorados a membrana plasmática ou como monômeros solubilizados na fenda (Soreq e Seiman, 2001). Liberada na fenda a ACh pode ativar dois tipos de receptores: nicotínicos ou muscarínicos (M) (Purves et al., 2001; Soreq e Seiman, 2001).

A AChE, enzima mais importante das colinesterases, é uma serina hidrolase que catalisa a hidrólise da ACh inativando-a e regulando a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica. Essa enzima contém uma unidade catalítica conhecida por tríade, composta por serina, histidina e glutamato, que se localiza no interior da enzima (Soreq e Seidman, 2001). A AChE apresenta duas formas moleculares: forma assimétrica, localizada na junção neuromuscular e a forma globular, existente como monômeros (G1), dímeros (G2) ou tetrâmeros (G4) catalíticos e localizam-se no SNC (Talesa, 2001), sendo que a forma G4 ligada à membrana é a mais abundante do SNC (Das et al., 2001).

A ACh é responsável por várias funções por todo o organismo, dentre os quais, destacam-se: vasodilatação (pela liberação de óxido nítrico (ON)), contração, miose, secreção salivar, bradicardia e controle da transmissão de impulsos nervosos através de sinapses colinérgicas. Além disso, é essencial na formação, manutenção e evocação de memória e aprendizagem (Taylor & Brown, 1994; Milatovic & Dettbarn, 1996). Diante dos sintomas clínicos já descritos da tirosinemia tipo II e por até o momento não apresentar dados da enzima AChE dessa doença na literatura, acredita-se que a enzima AChE pode estar alterada.

1.5 JUSTIFICATIVA

Considerando que pacientes com tirosinemia tipo II apresentam sintomas como tremor, ataxia, distúrbios na coordenação motora, déficit de linguagem, atraso cerebral, déficit cognitivo e que os mecanismos das disfunções neurológicas desses pacientes são pouco conhecidos; especula-se que o

metabolismo energético (Ramos et al., 2013), os fatores neurotróficos (Ferreira et al., 2013) e o sistema colinérgico estejam envolvidos no mecanismo fisiopatológico dessa doença. Portanto, neste trabalho foi investigado a toxicidade da tirosina sobre o metabolismo energético *in vivo* e *in vitro* em cérebro e fígado de ratos, bem como seu efeito sobre os níveis de BDNF e atividade da enzima AChE com o objetivo de contribuir na elucidação dos mecanismos bioquímicos responsáveis pelos sintomas neurológicos de pacientes tirosinêmicos, sendo que o déficit cognitivo é um dos sintomas mais relevantes da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da L-tirosina sobre parâmetros de metabolismo energético, fator neurotrófico e atividade da enzima acetilcolinesterase em ratos em diferentes fases do desenvolvimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito *in vitro* da L-tirosina sobre atividade das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase do ciclo de Krebs no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade;
- Avaliar o efeito *in vitro* da L-tirosina sobre os complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade;
- Avaliar o efeito da administração aguda de L-tirosina sobre atividade das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase do ciclo de Krebs no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade;
- Avalia o efeito da administração aguda de L-tirosina sobre os complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade;
- Avaliar o efeito da administração aguda de L-tirosina sobre os níveis de BDNF e análise transcricional (expressão) de BDNF no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade e com 30 dias de idade;
- Avaliar o efeito da administração crônica de L-tirosina sobre os níveis de BDNF e análise transcricional (expressão) de

BDNF no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos em desenvolvimento (sétimo ao trigésimo dia de idade);

- Avaliar a administração aguda de L-tirosina sobre a atividade da enzima AChE e análise transcricional (expressão) de *ache* no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade e com 30 dias de idade;

- Avaliar a administração crônica de L-tirosina sobre a atividade da enzima AChE e análise transcricional (expressão) de *ache* no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos em desenvolvimento (sétimo ao trigésimo dia de idade).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioenergética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (CEUA) sob o protocolo número 42/2010.

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 90 ratos machos da linhagem Wistar, destes 24 possuíam 7 dias de idade (10-20 g), 24 ratos possuíam 10 dias de idade (30-40 g) e 42 apresentaram 30 dias de idade (100-150 g). Considerando que todos os experimentos foram realizados com n de 6 ratos cada grupo, e a análise semi-quantitativa de transcriptase reversa de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) foi utilizado os mesmos ratos da análise dos níveis de BDNF e atividade de AChE correspondente. Os ratos foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense e foram mantidos em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 - 19:00) (Claro das 7:00 - 19:00) com comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.2 EXPERIMENTO *IN VITRO*

Preparação da amostra e incubação: Ratos Wistar machos de 30 dias de idade sofreram eutanásia por decapitação, o cérebro e fígado removidos e as estruturas cerebrais isoladas. A seguir, o

córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado foram homogeneizados em tampões específicos de cada técnica. O homogeneizado obtido foi levado à centrifugação por rotação e tempo segundo protocolos específicos para cada técnica. O sobrenadante obtido foi separado. Finalmente, alíquotas foram retiradas e armazenadas para posterior análise. O tempo de incubação dependeu de cada experimento, sendo incubado o homogeneizado na ausência da tirosina (grupo controle) ou na presença da mesma, nas concentrações de 0.1 mM; 1.0 mM; 2.0 mM ou 4.0 mM baseado no estudo de Sgaravatti e colaboradores (2008).

3.3 EXPERIMENTO *IN VIVO*

A L-tirosina foi diluída em solução salina (potencial hidrogeniônico (pH) foi ajustado para 7,4) e o equivalente a 500 mg/kg de L-tirosina livre foi administrada por via intraperitoneal. Esta dose foi escolhida de forma a obter as concentrações de tirosina cerca de 10 vezes mais que o fisiológico, 1 hora após a administração (Morre et al., 1980; Bongiovanni et al., 2003), que são variações de concentração semelhante à tirosina plasmática observada em pacientes afetados pela tirosinemia tipo II (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013).

3.3.1 Administração aguda

Para a administração aguda de L-tirosina uma única administração intraperitoneal de salina (grupo controle) ou L-tirosina (500 mg/kg) foi administrada em ratos com 10 e 30 dias de idade. Após 1 hora da administração os ratos sofreram eutanásia por decapitação e as estruturas cerebrais como córtex cerebral, hipocampo e estriado foram separadas para as dosagens bioquímicas, e somente ratos com 30 dias de idade foram utilizados para retirar o fígado para análises do metabolismo

energético. Para as amostras que foram realizadas análise transcricional, as amostras foram armazenadas em TRIzol[®].

3.3.2 Administração crônica

Para a administração crônica de L-tirosina, ratos com 7 dias de idade receberam administrações diárias intraperitoneal de salina (grupo controle) ou L-tirosina (500 mg/kg), a cada 12 horas, durante 23 dias. Após 12 horas da última administração, os ratos sofreram eutanásia por decapitação, e as estruturas cerebrais como córtex cerebral, hipocampo e estriado foram separadas para as dosagens bioquímicas. Para as amostras que foram realizadas análise transcricional, foram armazenadas em TRIzol[®].

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.4.1 Atividade das enzimas do ciclo de Krebs

Atividade da citrato sintase: A atividade da enzima citrato sintase foi avaliada em um meio de incubação contendo 5',5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) 0,1 mM, ácido oxaloacético 0,2 mM, Triton X-100 0,1 % e acetil-CoA 0,1 mM, em um tampão Tris-(ácido clorídrico) HCl 100 mM, pH 8,0. A redução do DTNB a ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm por 5 minutos a 25°C (Srere, 1969).

Atividade da malato desidrogenase: A atividade NADH-específica da malato desidrogenase foi avaliada espectrofotometricamente conforme o método descrito por Kitto (1969). A reação foi iniciada após a adição de oxaloacetato e o consumo de NADH foi acompanhado através da redução da absorbância em 340 nm durante 3 a 5 minutos a 37°C.

Atividade da succinato desidrogenase: Para a medida da atividade da enzima succinato desidrogenase, ao meio de incubação

contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, succinato de sódio 1 mM e dicloroindofenol (DCIP) 9 μ M, foi adicionado na amostra contendo cerca de 80 a 140 μ g de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 μ M, metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 μ M. A redução do DCIP é determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C (Fischer et al., 1985).

3.4.2 Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial

Atividade do complexo I: A atividade da NADH desidrogenase foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi (1996) pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm.

Atividade do complexo II: O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 mM). Inicialmente pré-incubar com 40-80 g de proteínas do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 mM de rotenona e a reação iniciou com adição de 40 M de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) (Fischer *et al.*, 1985). Os resultados foram expressos em nmol. min^{-1} . mg de proteína⁻¹

Atividade do complexo II-III: O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), contendo succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 mg de proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 mM de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 mg/mL de citocromo *c* e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II-III foi medida pelo aumento da

absorbância causado pela redução do citocromo *c* (Fischer *et al.*, 1985). Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo *c* oxidase): O meio de incubação foi composto por tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), dodecil-maltisídeo (0,6 mM) e 10-20 mg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 mg de citocromo *c* reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C por 10 minutos. A atividade da citocromo *c* oxidase foi medida pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido. As leituras foram feitas a 550 nm (Rustin *et al.*, 1994). Os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

3.4.3 Avaliação dos níveis de BDNF

Níveis de BDNF em amostras de cérebro foram determinados por imunoensaio (ELISA Sanduíche) através dos kits da Chemicon International e R&D Systems. Resumidamente, placas de microtitulação foram revestidas durante a noite à temperatura ambiente com o anticorpo monoclonal anti-BDNF a 4 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato-salino PBS. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e foi bloqueada durante 1 hora com PBS contendo leite em pó desnatado a 5%. Após a lavagem, as placas foram revestidas durante a noite a 4°C, com as amostras diluído a 1:200 em diluente de amostra (PBS com Albumina de soro bovino (BSA) a 1%) e a curva padrão variou de 7,8 a 500 pg/mL de BDNF. As placas foram lavadas novamente e foi adicionado um anticorpo anti-BDNF biotilado a 0,2 $\mu\text{g/mL}$ em PBS, o qual foi incubado durante 2 horas. Após a lavagem, foi realizada a incubação durante 1 hora a temperatura ambiente com streptavidinperoxidase conjugado (diluído a 1:1000 em diluente da amostra). Depois, as placas foram lavadas e incubadas com o substrato durante 20 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionada solução de paragem e então determinado os níveis de BDNF por absorvância a 450 nm. A

curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica e concentração de BDNF.

3.4.4 Avaliação da atividade da enzima acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi determinada pelo método de espectrometria de acordo com a técnica descrita por Ellman e colaboradores (1961). Os índices de hidrólise foram mensurados na presença de ACh na concentração de 0,8 mM em 1,0 mL de solução com 30 mM de tampão fosfato pH 7,5 e 1,0 mM de DTNB a 25°C. O resultado da reação de hidrólise da solução foi medido pela formação de tiolato de di-ânion a 412 nm.

3.4.5 Desenho dos primers e análise semi-quantitativa de RT-PCR

Primers específicos foram desenhados utilizando o programa Oligos 9.6. Com o objetivo de confirmar a especificidade dos primers desenhados, cada primer foi comparado com o genoma humano. Foi utilizado apenas primers que anelaram com as respectivas sequências alvo, impedindo uma amplificação não específica. O RNA foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantificação do RNA foram realizadas por espectrofotometria através da relação dos valores de absorbância a 260 e 280 nm. Todas as amostras foram ajustadas para uma concentração de 160 ng/μL e o ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) de cada amostra foi sintetizado utilizando o kit “SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix” (Invitrogen, USA). Para cada conjunto de reações de reação de cadeia polimerase (PCR), foi incluído um controle negativo. Os produtos de PCR foram identificados em gel de agarose 1% utilizando o marcador de peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen, USA). A abundância relativa de cada mRNA foi determinada por comparação com o mRNA do gene da *β-actina* utilizando o programa “ImageJ 1.37” para

Windows. Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes utilizando RNA isolado de extrações independentes.~

3.4.6 Determinação da proteína

Foi realizada através do método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando a albumina sérica bovina como padrão.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados obtiveram uma distribuição normal, para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para análise dos dados obtidos na determinação dos efeitos bioquímicos do composto testado seguido do teste post hoc de Tukey. Na comparação entre duas médias foi utilizado o teste de Student para amostras independentes ou pareadas. As análises estatísticas foram feitas pelo programa SPSS versão 17.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

O presente estudo avaliou o efeito *in vitro* e *in vivo* de L-tirosina sobre o metabolismo energético no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade. Este estudo também analisou os níveis de BDNF e mRNA para *bdnf* no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos após administração aguda da L-tirosina em ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica de L-tirosina em ratos em desenvolvimento, e por fim foi avaliado a atividade da AChE e mRNA de *ache* no córtex cerebral, hipocampo, estriado de ratos após administração aguda de L-tirosina em cérebro de ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica de L-tirosina no córtex cerebral, hipocampo, estriado de ratos em desenvolvimento.

4.1 METABOLISMO ENERGÉTICO *IN VITRO*

Foi avaliado o efeito *in vitro* da L-tirosina, nas concentrações de 0.1; 1.0; 2.0 ou 4.0 mM, sobre o metabolismo energético no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade. O efeito da L-tirosina sobre a atividade da enzima citrato sintase ocasionou uma diminuição na atividade desta enzima somente no córtex cerebral nas concentrações de 2.0 e 4.0 mM, enquanto que nas demais concentrações não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Quando avaliado a atividade da enzima succinato desidrogenase observou-se um aumento no hipocampo nas concentrações de 1.0; 2.0 ou 4.0 mM e no estriado somente na concentração de 4.0 mM de L-tirosina. No córtex cerebral e no fígado houve um aumento da atividade da succinato desidrogenase em todas as concentrações de L-tirosina avaliadas, quando comparado ao grupo controle. No entanto, a atividade da enzima malato desidrogenase não foi alterada nas estruturas

analisadas e nas concentrações de L-tirosina avaliadas quando comparada ao grupo controle (Figura 7).

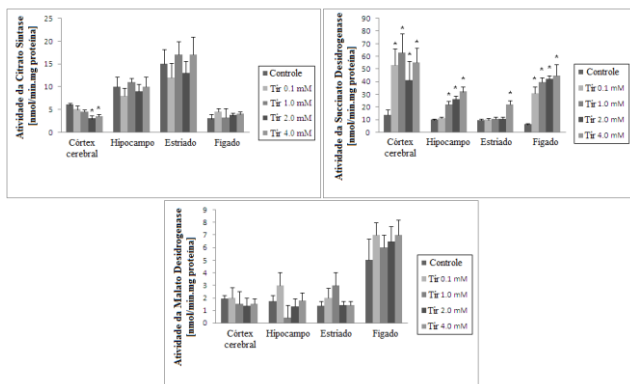


Figura 7: Efeito *in vitro* da L-tirosina sobre atividade da enzima citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por post-hoc Tukey quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm desvio padrão (D.P.) (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$. Tir = L-tirosina.

A atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial também foram avaliadas no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade. A atividade do complexo I foi diminuída somente no hipocampo e na maior concentração de L-tirosina (4.0 mM), enquanto as demais estruturas em diferentes concentrações de L-tirosina avaliadas não foram significativamente diferentes quando comparado ao grupo controle. No complexo II foi observada uma diminuição da sua atividade no córtex cerebral e em todas as concentrações de L-tirosina testadas, e no fígado também houve uma diminuição da atividade do complexo II nas concentrações de 1.0; 2.0 e 4.0 mM. No entanto, a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória mitocondrial não foi alterada nas estruturas e concentrações de L-tirosina testadas quando comparado ao grupo controle. Já o complexo IV apresentou uma diminuição na

sua atividade somente no córtex cerebral nas concentrações de 1.0; 2.0 e 4.0 mM quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

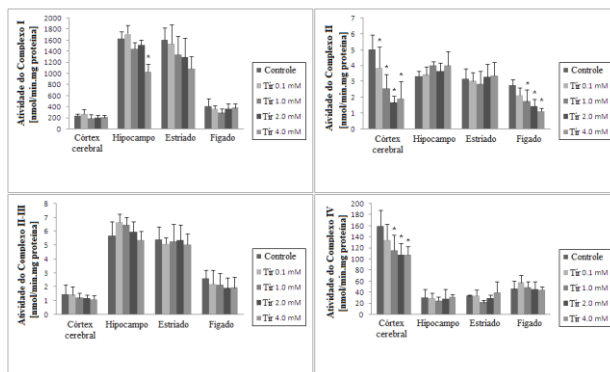


Figura 8: Efeito *in vitro* da L-tirosina sobre atividade dos complexos I, II, II-III e IV no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por post-hoc Tukey quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm D.P. (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$. Tir = L-tirosina.

O efeito *in vitro* da L-tirosina sobre atividade das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase, malato desidrogenase, complexo I, complexo II, complexo II-III e complexo IV no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade foi resumido na tabela 1.

Tabela 1: Efeito *in vitro* da L-tirosina sobre atividade das enzimas do metabolismo energético em cérebro e fígado de ratos com 30 dias de idade.

	Córtex Cerebra l	Hipocamp o	Estriad o	Fígado
Citrato Sintase	↓ 2.0 e 4.0 mM	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	Não houve alteraçã o
Succinato Desidrogenas e	↑ 0.1, 1.0, 2.0 e 4.0 Mm	↑ 1.0, 2.0 e 4.0 mM	↑ 4.0 mM	↑ 0.1, 1.0, 2.0 e 4.0 mM
Malato Desidrogenas e	Não houve alteração	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	Não houve alteraçã o
Complexo I	Não houve alteração	↓ 4.0 mM	Não houve alteraçã o	Não houve alteraçã o
Complexo II	↓ 0.1, 1.0, 2.0 e 4.0 Mm	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	↓ 1.0, 2.0 e 4.0 mM
Complexo II- III	Não houve alteração	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	Não houve alteraçã o
Complexo IV	↓ 1.0, 2.0 e 4.0 mM	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	Não houve alteraçã o

4.2 METABOLISMO ENERGÉTICO *IN VIVO*

Após administração aguda da L-tirosina em ratos com 30 dias de idade foi avaliado a atividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs, como citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase, no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos. Foi observado que a atividade da enzima citrato sintase foi diminuída no córtex cerebral e fígado de ratos quando comparado ao grupo controle. Enquanto que no estriado houve um aumento na atividade da citrato sintase após a administração aguda de L-tirosina. Quando avaliado a atividade da enzima succinato desidrogenase foi diminuída no córtex cerebral e aumentada no estriado quando comparado ao grupo controle, após administração aguda de L-tirosina. No entanto, a atividade da enzima malato desidrogenase foi diminuída no córtex cerebral e fígado de ratos com 30 dias de idade após administração aguda de L-tirosina quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

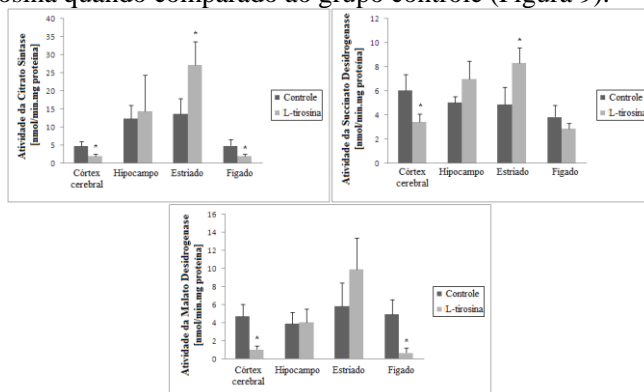


Figura 9. Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre atividade da enzima citrato sintase, succinato desidrogenase e malato desidrogenase no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade. Os dados foram analisados por teste Student quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm D.P. (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$.

A atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial também foi avaliada após administração aguda de L-tirosina no córtex cerebral, hipocampo, estriado, fígado de ratos com 30 dias de idade. Foi observado que a atividade do complexo I foi diminuída no córtex cerebral e aumentada no estriado quando comparado ao grupo controle. No entanto, a atividade do complexo II quando avaliada foi observado uma diminuição no córtex cerebral e fígado de ratos, após administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade quando comparado ao grupo controle. O mesmo observou-se na atividade do complexo II-III, onde houve uma diminuição no córtex cerebral e fígado de ratos após administração aguda de L-tirosina quando comparado ao grupo controle. A atividade do complexo IV também foi diminuída no córtex cerebral e fígado de ratos com 30 dias de idade após administração aguda de L-tirosina (Figura 10).

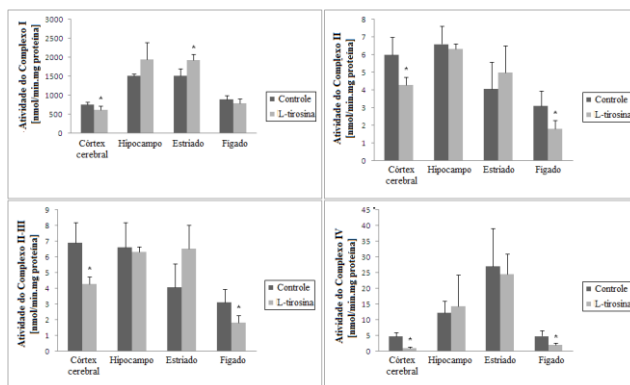


Figura 10: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre atividade dos complexos I, II, II-III e IV no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade. Os dados foram analisados por teste Student quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm D.P. (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$.

O efeito *in vivo* da L-tirosina sobre atividade das enzimas citrato sintase, succinato desidrogenase, malato desidrogenase,

complexo I, complexo II, complexo II-III e complexo IV no córtex cerebral, hipocampo, estriado e fígado de ratos com 30 dias de idade foi resumido na tabela 2.

Tabela 2: Efeito *in vivo* da L-tirosina sobre atividade das enzimas do metabolismo energético em cérebro e fígado de ratos com 30 dias de idade.

	Córtex Cerebra l	Hipocamp o	Estriad o	Fígado
Citrato Sintase	↓	Não houve alteração	↑	↓
Succinato Desidrogenas e	↓	Não houve alteração	↑	Não houve alteraçã o
Malato Desidrogenas e	↓	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	↓
Complexo I	↓	Não houve alteração	↑	Não houve alteraçã o
Complexo II	↓	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	↓
Complexo II- III	↓	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	↓
Complexo IV	↓	Não houve alteração	Não houve alteraçã o	↓

4.3 NÍVEIS DE BDNF E mRNA *BDNF*

Os níveis de BDNF e expressão de mRNA para *bdnf* foram avaliados no córtex cerebral, hipocampo e estriado após administração aguda de L-tirosina de ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica de L-tirosina no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos em desenvolvimento. Em ratos com 10 dias de idade houve uma diminuição nos níveis de BDNF apenas no estriado após administração aguda de L-tirosina. No entanto, em ratos com 30 dias de idade houve uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo e estriado após administração aguda de L-tirosina quando comparado ao grupo controle. Após administração crônica de L-tirosina foi observado um aumento nos níveis de BDNF no estriado de ratos em desenvolvimento quando comparado ao grupo controle (Figura 11 A, B e C respectivamente).

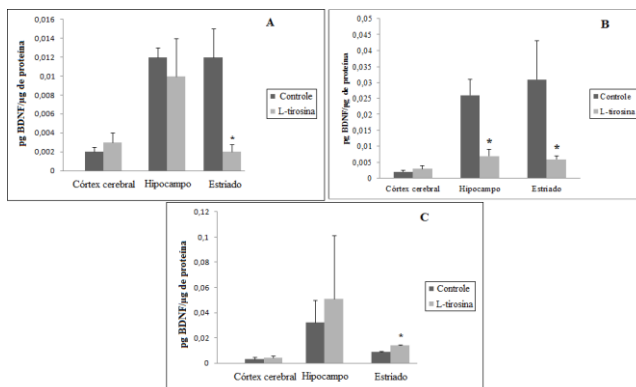


Figura 11: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre os níveis de BDNF no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade (A), com 30 dias de idade (B) e após administração crônica de L-tirosina (C). Os dados foram analisados por teste Student quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm D.P. (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$.

Após avaliação dos níveis de BDNF, foi analisado o mRNA de *bdnf* nas estruturas cerebrais que houve alteração nos níveis da neurotrofina de ratos com 10 e 30 dias de idade após administração aguda de L-tirosina, e após administração crônica de L-tirosina em ratos em desenvolvimento. Em ratos 10 dias de idade, houve uma diminuição na expressão de mRNA de *bdnf* no estriado quando comparado ao grupo controle, após administração aguda de L-tirosina em estriado. No entanto com ratos de 30 dias de idade, não houve alteração na expressão de mRNA de *bdnf* quando comparado ao grupo controle, após administração aguda de L-tirosina no hipocampo e estriado. Após administração crônica de L-tirosina não houve uma alteração na expressão de mRNA de *bdnf* no estriado de ratos em desenvolvimento quando comparado ao grupo controle (Figura 12 A, B e C respectivamente).

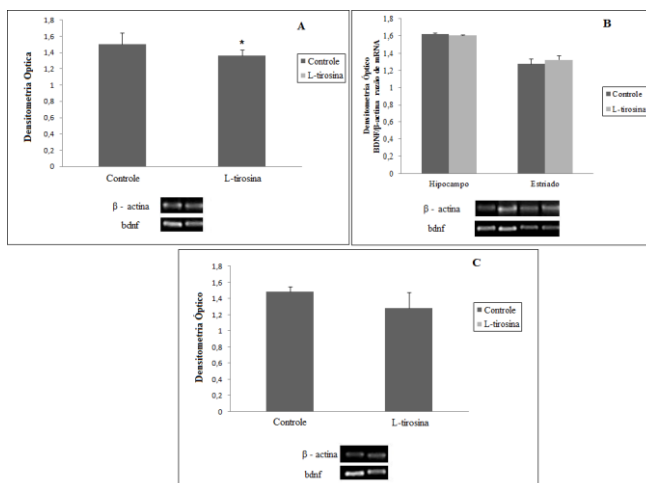


Figura 12: Expressão do mRNA de *bdnf* no estriado de ratos com 10 dias de idade após administração aguda de L-tirosina (A), no hipocampo e estriado de ratos com 30 dias de idade (B) e no estriado após administração crônica de L-tirosina (C). Os dados foram analisados por teste Student quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm D.P. (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$.

O efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre os níveis de BDNF e expressão de mRNA de *bdnf* em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com diferentes idades foi resumido na tabela 3.

Tabela 3: Efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre os níveis de BDNF e mRNA de *bdnf* em cérebro de ratos com diferentes idades.

	Córtex Cerebral	Hipocampo	Estriado
Níveis de BDNF	Não houve alteração	↓ após administração aguda em ratos com 30 dias de idade	↓ após administração aguda em ratos com 10 e 30 dias de idade, e ↑ após administração crônica
Níveis de mRNA de <i>bdnf</i>	Não houve alteração	Não houve alteração	↓ após administração aguda em ratos com 10 dias de idade

4.4 ATIVIDADE DA AChE E mRNA DE *ache*

A atividade da enzima AChE e expressão do mRNA para *ache* foram avaliadas após administração aguda de L-tirosina no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica de L-tirosina em ratos em desenvolvimento. Nossos resultados demonstraram que houve um aumento na atividade da AChE no córtex cerebral, hipocampo, estriado em ratos de 10 dias de idade após administração aguda de L-tirosina. O mesmo aconteceu após administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade, onde houve um aumento na atividade da enzima AChE no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos. Após administração crônica de L-tirosina houve um aumento na atividade da enzima AChE no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos em desenvolvimento (Figura 13 A, B e C respectivamente).

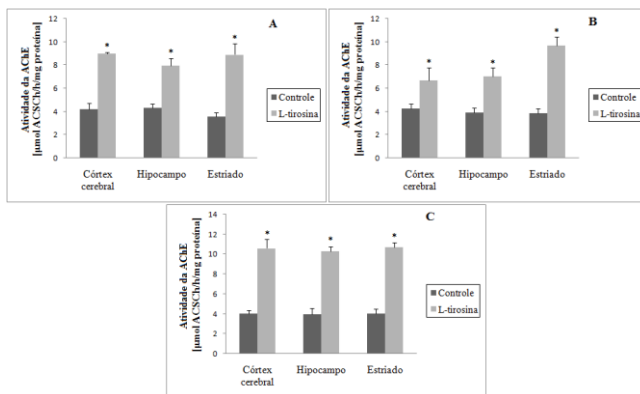


Figura 13: Efeito da administração aguda de L-tirosina sobre atividade da enzima AChE no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade (A), com 30 dias de idade (B) e após administração crônica de L-tirosina (C). Os dados foram analisados por teste Student quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm D.P. (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$.

Após avaliação da atividade da enzima AChE, foi analisado o mRNA de *ache* nas estruturas cerebrais que houve alteração na atividade enzimática de ratos com 10 e 30 dias de idade após administração aguda de L-tirosina, e após administração crônica de L-tirosina em ratos em desenvolvimento. Nossos resultados demonstraram que houve uma diminuição no mRNA de *ache* somente no hipocampo, após administração aguda de L-tirosina em ratos com 10 dias de idade. Após administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade houve uma diminuição no mRNA de *ache* somente no hipocampo quando comparado ao grupo controle. E por fim após administração crônica de L-tirosina houve uma diminuição no mRNA de *ache* no estriado de ratos em desenvolvimento (Figura 14 A, B e C respectivamente).

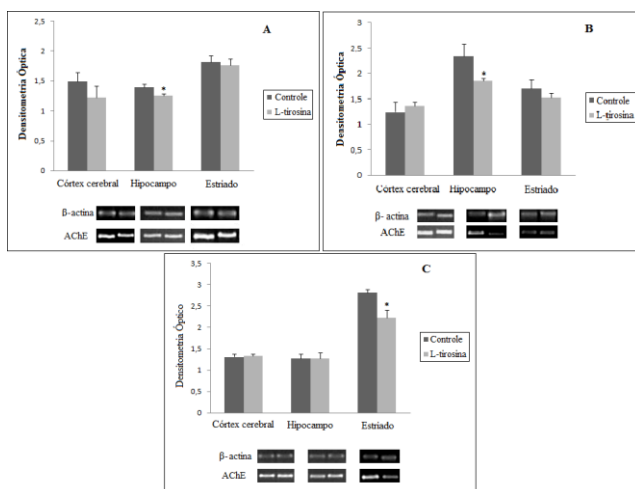


Figura 14: Expressão do mRNA de *ache* no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com 10 dias de idade (A), com 30 dias de idade (B) após administração aguda de L-tirosina, e após administração crônica de L-tirosina (C). Os dados foram analisados por teste Student quando F for significativo. Valores são expressos por nmol/min.mg proteína, média \pm D.P. (n=6). * Diferente do controle; $p < 0.05$.

O efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre a atividade da AChE e níveis de mRNA de *ache* no córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos com diferentes idades foi resumido na tabela 4.

Tabela 4: Efeito da administração aguda e crônica de L-tirosina sobre a atividade da AChE e os níveis de mRNA de *ache* em cérebro de ratos com diferentes idades.

	Córtex Cerebral	Hipocampo	Estriado
Atividade da AChE	↑ após administração aguda em ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica	↑ após administração aguda em ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica	↑ após administração aguda em ratos com 10 e 30 dias de idade, e após administração crônica
Níveis de mRNA de <i>ache</i>	Não houve alteração	↓ após administração aguda em ratos com 10 e 30 dias de idade	↓ após administração crônica

5 DISCUSSÃO

A tirosinemia tipo II é caracterizada pelos altos níveis de tirosina nos tecidos e fluidos fisiológicos de pacientes deficientes da enzima TAT (Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013). Os sintomas decorrentes da deficiência da TAT são bem descritos, porém os mecanismos responsáveis pela fisiopatologia deste transtorno metabólico ainda são obscuros. Desta forma, o presente trabalho avaliou o efeito da L-tirosina sobre as enzimas do metabolismo energético em cérebro e fígado de ratos, sobre o BDNF e a enzima AChE em cérebro de ratos.

Sabendo que a TAT é produzida nos hepatócitos, e que a tirosinemia tipo II é caracterizada pela deficiência desta enzima, justifica-se a utilização do fígado no presente trabalho, já que um acúmulo de tirosina e/ou seus metabólitos podem levar a danos no fígado por uma sobrecarga do mesmo e consequentemente a danos no SNC por diferentes mecanismos ainda não esclarecidos (Nakamura et al, 2007). O córtex cerebral, hipocampo e estriado foram avaliados, uma vez que entre os sintomas mais prevalentes nos pacientes com tirosinemia tipo II, encontra-se déficit de aprendizado, linguagem e tremor (Lemonnier et al., 1979; Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Valikhani et al., 2005). Adicionalmente Morre e colaboradores (1980) demonstraram altas concentrações de L-tirosina no córtex cerebral após administração de tirosina em ratos com 10 dias de idade, quando comparado com o grupo controle. Sendo assim, é possível que danos nestas estruturas possam explicar parte da sintomatologia da tirosinemia tipo II.

O desenvolvimento do SNC ocorre em fases que segue uma sequência precisa (Morgane et al., 1992). Sendo assim, no presente estudo, foram utilizados ratos de diferentes idades para acompanhar o desenvolvimento do cérebro. Slotkin e colaboradores (2005) identificaram uma elevação das exigências metabólicas e, assim, aumento da vulnerabilidade das células neuronais nos períodos de pico de diferenciação. O período mais rápido de crescimento dendrítico em cérebro de ratos encontra-se entre 8 a 14 dias pós-natal e, entre 2 e 3 anos em humanos

(Uylings, 2000). Semelhante a outras doenças metabólicas hereditárias, os pacientes tirosinemicos submetidos a níveis elevados de metabólitos acumulados (ou seja, tirosina) no período pós-natal, apresentam sintomas durante estágios críticos do desenvolvimento do SNC (Mitchell et al., 1995). Processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular ocorrem no cérebro durante este período (Mistretta e Bradley, 1978). Entretanto, em algumas estruturas, como o giro denteado no hipocampo, o fenômeno de neurogênese (nascimento e maturação celular de neurônios) ocorre durante o período de desenvolvimento dos animais e seres humanos (Malberg, 2004).

Neste sentido nós demonstramos que a L-tirosina *in vitro* inibiu a atividade da citrato sintase no córtex cerebral, enquanto a atividade da succinato desidrogenase foi aumentada no córtex cerebral, hipocampo, estriado e no fígado. A atividade na malato desidrogenase não houve alteração quando comparada ao grupo controle. A atividade do complexo I foi inibida no hipocampo, a atividade do complexo II foi inibida no córtex cerebral e fígado, a atividade do complexo II-III não foi alterado e a atividade do complexo IV foi diminuído no córtex cerebral. Após administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade, observou-se uma inibição da atividade da citrato sintase no córtex cerebral e fígado, porém no estriado houve um aumento dessa atividade. A atividade da succinato desidrogenase e do complexo I foram diminuídas no córtex cerebral e aumentadas no estriado. A atividade da malato desidrogenase, complexos II, II-III e IV foram diminuídas no córtex cerebral e fígado após administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade.

Os presentes resultados demonstraram um decréscimo do metabolismo energético no córtex cerebral semelhantes aos resultados observados em estudos anteriores que descrevem uma diminuição na atividade da piruvato quinase e creatina quinase em frações citosólicas e mitocondriais no córtex cerebral de ratos com 14 dias de idade, após administração aguda de L-tirosina (de Andrade et al., 2011; 2012). Curiosamente, os nossos resultados demonstraram um aumento na atividade da citrato sintase, succinato desidrogenase e complexo I somente no estriado. Nós

sugerimos que este aumento pode resultar em um mecanismo compensatório inicial, sendo que estudos anteriores têm demonstrado que o gânglio basal, composto pelo globo pálido, corpo estriado e substância nigra, é uma região cerebral afetada na tirosinemia tipo II, causando astrocitose, atraso da mielinização e estado de espongiose (divisão da mielina e vacuolização) (Sener, 2005). Essas alterações na concentração de mielina podem reduzir a produção aeróbica de ATP através das enzimas do metabolismo energético e complexos da cadeia respiratória mitocondrial (Morelli et al., 2011).

Stoerner e colaboradores (1980) demonstraram que um elevado nível de tirosina no soro de pacientes pode afetar o metabolismo da dopamina no cérebro. Desta forma, sugerimos outra hipótese para o aumento do metabolismo energético no estriado, ou seja, na tirosinemia tipo II em um primeiro momento pode ocorrer um efeito direto da tirosina nos neurônios estriatais estimulando a produção de dopamina, em um curto período de tempo, e isso pode resultar no aumento do metabolismo energético.

O nível cerebral preciso de tirosina no cérebro de pacientes com tirosinemia tipo II não é conhecida. No entanto, níveis de tirosina no plasma de pacientes com tirosinemia tipo II não tratados podem ultrapassar 1000 μM (Scott, 2006), mas outros estudos mostram que os valores de tirosina no plasma variam de 370 a 3420 μM em crianças (Goldsmith et al., 1973; Lemonnier et al., 1979; Rabinowitz et al., 1995; Macsai et al., 2001; Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Sgaravatti et al., 2009), enquanto os níveis típicos de tirosina plasmática em humanos apresentam-se de 30 a 90 μM (Scriver e Rosenberg, 1973).

Sgaravatti e colaboradores (2009) demonstram que a administração aguda de 500 mg/kg de L-tirosina pode promover estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos com 14 dias de vida. Considerando que as espécies reativas de oxigênio (ERO) inibem a cadeia respiratória mitocondrial, resultando na geração de mais ERO e assim tem a formação de um fenômeno cíclico (Adam-Vizi, 2005). Então, sugerimos que o estresse oxidativo

pode contribuir para a redução do metabolismo energético em cérebro de ratos conforme demonstrado em nossos resultados. Sendo assim, um excesso de subprodutos do catabolismo da tirosina pode causar distúrbios no ciclo da uréia, acidúria orgânica e diferentes graus de danos mentais, dependendo do nível e do tempo de exposição à toxina (García-Cazola et al., 2009).

Notavelmente, alguns mecanismos podem agir *in vivo* (mas não *in vitro*) e podem ser responsáveis pelos efeitos diferentes da tirosina observados em ambas as situações. Além disso, não se pode ignorar que os derivados da tirosina estão presentes *in vivo*. Isso pode ao menos, em parte, justificar os resultados encontrados no fígado após a ação da L-tirosina *in vitro*, que mostrou um aumento do metabolismo energético enquanto que *in vivo* apresentou uma inibição do metabolismo energético após administração aguda de L-tirosina.

Conforme visto em estudos anteriores, os erros inatos do metabolismo provocam alguns danos ao metabolismo energético ocasionando, algumas vezes, problemas como anormalidades cerebrais, pelo déficit de ATP, como na doença do xarope do bordo (Ribeiro et al., 2008), homocisteína (Kolling et al., 2012) e tirosinemia tipo I (Rigante et al., 2005). Neste sentido, conforme nossos resultados a L-tirosina ocasiona danos ao metabolismo energético tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que ajuda a entender a fisiopatologia da tirosinemia tipo II.

Por conseguinte, estudos sugerem que o aumento do estresse oxidativo está associado com a diminuição dos níveis de BDNF, embora uma relação causal não possa ser inferida (Wu et al., 1996.; Kapczinski et al., 2008). Vários mecanismos pelos quais o estresse oxidativo pode diminuir os níveis de BDNF foram sugeridos, incluindo a depleção de ATP (Wu et al., 1996).

O BDNF é uma neurotrofina conhecida por desempenhar papel importante na sobrevivência, diferenciação e plasticidade neuronal (Snider, 1994; Kubo et al., 1995; Lewin e Barde, 1996; Nonomura et al., 1996). Estudos demonstram que o BDNF aumenta insultos excitotóxicos sob certas condições, e os efeitos do aumento da morte por fatores neurotróficos, tais como o

BDNF, podem ser divididos em dois aspectos: capacidade de aumentar o número final de células apoptóticas e a capacidade de acelerar o processo apoptótico (Gwag et al., 1995; Koh et al., 1995).

De acordo com Monteggia e colaboradores (2004), o papel do BDNF em cérebro de adultos pode ser diferente quando comparado com cérebro em desenvolvimento. De fato, a perda seletiva de BDNF no cérebro de ratos adultos resulta na disfunção do hipocampo, e essa perda de BDNF durante os estágios iniciais de desenvolvimento cerebral contribui para hiperatividade e deficiências graves de aprendizado hipocampo-dependentes (Morgane et al., 1992).

O envolvimento do SNC em pacientes tirosinêmicos é variável. Pode apresentar desde retardo mental grave até pequenos danos cerebrais podendo estar associado com microcefalia, tremor, ataxia, comportamento auto-mutilador, bem como distúrbios de coordenação motora, déficit de linguagem e convulsões (Goldsmith et al., 1973; Lemonnier et al., 1979; Rabinowitz et al., 1995; Macsai et al., 2001; Mitchell et al., 1995, Mitchell et al., 2001, 2013; Valikhani et al., 2005).

Neste estudo nós demonstramos que a administração aguda de L-tirosina em ratos com 10 dias de idade diminuiu os níveis de BDNF e expressão mRNA para *bdnf* no estriado, o que sugere que a diminuição dos níveis de BDNF observados neste estudo está diretamente relacionado com uma menor expressão de mRNA para *bdnf*. Além disso, nós demonstramos que administração aguda de L-tirosina em ratos com 30 dias de idade houve uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo e estriado, porém não houve modificações nos níveis de transcrição de BDNF em ambas as estruturas. Estes achados sugerem uma modulação pós-transcricional dos níveis de BDNF. Baydyuk e colaboradores (2011) demonstraram que a maioria dos receptores da proteína tirosina quinase B (TrkB) está localizado em neurônios do estriado de cérebro de rato adulto e a deleção do receptor TrkB no estriado em desenvolvimento pode causar uma diminuição da sobrevivência neuronal devido a perda seletiva dos neurônios do estriado. Estes resultados corroboram com o estudo

publicado por Gokce e colaboradores (2009) os quais demonstraram que proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) servem como indutoras da expressão do gene BDNF no estriado e que ativação transcricional mediada pelo BDNF no estriado requer receptores TrkB e cálcio intracelular e extracelular.

Por outro lado, a administração crônica de L-tirosina aumentou os níveis de BDNF e não alterou a expressão de mRNA para *bdnf* no estriado. Koh e colaboradores (1995) relataram que doses elevadas de BDNF (em concentrações de 10 a 100 ng/mL) podem acelerar a necrose neuronal excitotóxica. Altos níveis de BDNF (12–20 ug/dia) inibem, significativamente, a regeneração axonal motora, mas em doses relativamente baixas desta neurotrofina (0,5-2 ug/dia) pode promover regeneração de neurônios motores periféricos de ratos. De acordo com Croll e colaboradores (1999) a super-expressão do BDNF está associada com a hiperexcitabilidade, que pode contribuir para os déficits de aprendizagem e de plasticidade. Assim, é possível especular que o aumento do BDNF no estriado após a administração crônica de L-tirosina pode estar associada com o aumento da excitabilidade cerebral. Além disso, o ensaio sanduiche ELISA não permite distinguir entre pró-BDNF e o BDNF maduro, assim o aumento dos níveis de BDNF total pode ser associado com o aumento de pró-BDNF e serve como ligante para o p75NTR e então iniciar a apoptose neuronal (Lee et al., 2001; Teng et al., 2005). Portanto é possível que o aumento dos níveis de BDNF possa ser um efeito protetor em resposta à toxicidade da L-tirosina.

Os estudos parecem revelar um mecanismo pelo qual os eventos que são classicamente relacionados com a manutenção do equilíbrio de energia em uma célula, como estresse oxidativo, podem interagir com os eventos moleculares que modulam a plasticidade neuronal e comportamental (Wu et al, 1996; Kapczinski et al., 2008). O estresse oxidativo pode reduzir a expressão do mRNA para *bdnf*, diminuindo CREB (Zou e Crews, 2006). Além disso, os produtos de peroxidação lipídica podem diminuir a ativação de CREB nos neurônios do hipocampo (Pugazhenthii et al., 2006). Por outro lado, Sgaravatti e

colaboradores (2009) mostraram que a administração aguda de L-tirosina promove o estresse oxidativo no cérebro de ratos com 14 dias de idade e, eventualmente, estimula o dano oxidativo à lipídios e proteínas. Assim, o estresse oxidativo pode contribuir para a diminuição dos níveis de BDNF observados após a administração aguda de L-tirosina.

A hipertirosinemia diminui os níveis de BDNF de maneira semelhante a outros erros inatos de metabolismo. Curiosamente, um estudo realizado por Matté e colaboradores (2009) mostraram que a administração aguda de homocisteína em ratos provocou uma deficiência na consolidação da memória de curto e longo prazo em relação a tarefa de esQUIVA inibitória, e reduziram os níveis de BDNF no hipocampo. Kim e colaboradores (2006) demonstraram que ratos com doença de Gaucher apresentaram uma redução na expressão de *bdnf* e de *ngf* no córtex cerebral, tronco cerebral e cerebelo. Além disso, Zhang e colaboradores (2010) demonstraram que os níveis de BDNF e a expressão de mRNA para *bdnf*, além da fosforilação da Akt foram diminuídos após administração de fenilalanina.

Os resultados deste estudo indicam que a administração aguda de L-tirosina diminuiu os níveis de BDNF e a administração crônica ocasionou um aumento nos níveis do mesmo. Assim, sugerimos que uma regulação anormal da expressão de BDNF poderia contribuir, pelo menos em parte, com os danos cerebrais característicos na tirosinemia tipo II.

Neste estudo observamos que a administração aguda e crônica de L-tirosina apresentam diferentes efeitos no cérebro. A justificativa para esta discrepância não é clara, mas pode estar relacionada com os efeitos de dessensibilização da L-tirosina repetida ou ainda com o mecanismo de adaptação, visto que a estimulação excessiva dos receptores de dopamina durante a exposição à psicoestimulantes induz várias alterações adaptativas moleculares na via dopaminérgica mesolímbica (Nestler, 2005). Nós sugerimos que a estimulação excessiva dos receptores de dopamina durante a exposição da L-tirosina induz diferentes alterações cerebrais, como no hipocampo e estriado, quando

compara-se os efeitos da administração crônica com aguda de L-tirosina.

De acordo com nosso estudo a administração de L-tirosina induz a diminuição dos níveis de BDNF no cérebro de ratos em desenvolvimento. A redução de BDNF durante os estágios iniciais de desenvolvimento cerebral contribui para hiperatividade e deficiências graves de aprendizado (Monteggia et al., 2004).

Além deste fator neurotrófico, a ACh também está envolvida na formação, manutenção e evocação de processos de memória e aprendizagem. Este neurotransmissor é hidrolisado pela AChE, inativando-a e regulando sua concentração na fenda sináptica (Tõugu e Kesvatera, 1996; Soreq e Seidman, 2001). Foi descrito que a AChE também está envolvida com a ativação glial, fluxo sanguíneo cerebral, cascata amilóide, bem como proteína de adesão no desenvolvimento e manutenção sináptica (Ballard et al., 2005).

Os nossos resultados indicam que a administração aguda de L-tirosina em ratos de 10 e 30 dias de idade aumentou a atividade da AChE em hipocampo, estriado e córtex cerebral, enquanto quando avaliado o mRNA para *ache* foi visto que houve uma diminuição da expressão da enzima somente no hipocampo. Os resultados encontrados após administração crônica de L-tirosina em ratos durante seu desenvolvimento, foi um aumento na atividade da AChE em hipocampo, estriado e córtex cerebral, e o mRNA para *ache* foi diminuído no estriado quando comparado ao grupo controle. Um excesso no nível de ACh mostrou ser neurotóxico, enquanto o contrário também é verdade, já que o nível baixo de ACh na junção sináptica pode influenciar negativamente na memória (Tõugu e Kesvatera, 1996; Soreq e Seidman, 2001). Com base em nossos resultados, podemos sugerir que o aumento da atividade da AChE, causada pela administração de L-tirosina, pode conduzir a uma redução da neurotransmissão colinérgica devido a uma diminuição dos níveis de ACh na fenda sináptica. Estas descobertas podem explicar, pelo menos em parte, a progressiva disfunção cognitiva e outras

disfunções neurológicas vistas em pacientes afetados por tirosinemia tipo II.

A L-tirosina pode interferir no desenvolvimento do sistema colinérgico através do sistema dopaminérgico, visto que a tirosina é responsável pela produção de catecolaminas. As células colinérgicas estão presentes na área do corpo tegmentar ventral e substância nigra onde modulam a atividade dos neurônios dopaminérgicos. A região do terminal dopaminérgico do núcleo accumbens contém um pequeno, mas importante, grupo de interneurônios colinérgicos que possui extensas árvores dendríticas que formam sinapses com uma grande maioria de neurônios do núcleo accumbens. Juntamente com a entrada de ACh nos corpos celulares dopaminérgicos, o sistema colinérgico poderia desempenhar um papel vital no fluxo de informações sobre a propagação motivacional de estímulo através do sistema mesolímbico (Mark et al., 2011). Assim, acreditamos que um aumento nos níveis de tirosina, aumenta a síntese de catecolaminas e, conseqüentemente, pode interferir no desenvolvimento do sistema colinérgico.

No presente estudo, a expressão do mRNA para *ache* diminuiu significativamente após a administração crônica de L-tirosina no estriado enquanto que a atividade foi aumentada, sugerindo que esta região não está diretamente relacionado a uma maior expressão de *ache*. A maquinaria de transcrição é continuamente controlada pela regulação da transcrição/tradução, interações proteína-proteína/modificações e uma rede metabólica que forma um sistema que permite que a célula responda a estímulos diversos (Krishna et al., 2006). O fenômeno conhecido como feedback negativo (Salgado et al., 2001; Keseler et al., 2005), que está situado na interface entre as redes metabólicas e genéticas, poderia levar ao aumento concomitante da hidrólise de ACh e a diminuição dos níveis de AChE no hipocampo após administração aguda de L-tirosina. Grifman e colaboradores (1997) também demonstraram que a subunidade catalítica da proteína quinase AMPc-dependente (PKA) pode fosforilar a AChE.

Neste contexto, sugerimos que a fosforilação de PKA efetua a ativação da atividade da AChE após administração crônica de L-tirosina. Assim, a fosforilação de PKA pode ser um fator decisivo na mudança de conformação da enzima, causando um aumento na afinidade do substrato-enzima e da atividade das enzimas (Das et al., 2001; Melo et al., 2003; Aldunate et al., 2004). Um possível mecanismo para fosforilação da PKA é o estresse oxidativo desde que esteja envolvido em diferentes eventos, tais como, o aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e ativação do AMPC/PKA dependente da via (Leclerc et al., 1997; Aitken et al., 1998; Herrero et al., 2000). Neste contexto, o estudo realizado por Scaini e colaboradores (2012) demonstrou que o tratamento com antioxidante foi capaz de impedir o aumento da atividade da AChE em cérebro de ratos com 30 dias de idade após a indução de um modelo animal de doença do xarope do bordo, um erro do metabolismo, mas não alterou os níveis do mRNA para *ache*.

Muitos estudos foram realizados para definir a localização da AChE e as suas formas moleculares no cérebro (Koelle, 1963; Brimijoin e Hammond, 1996). Mecanismos pós-transcricional explicam a variação espacial e temporal da AChE. Diferentes mecanismos podem operar no cérebro, o que se torna possível que o conteúdo local de AChE em cada uma das áreas cerebrais reflète na taxa de produção local de AChE, e por sua vez, reflète na quantidade do mRNA para *ache* (Legay et al., 1993). A mais convincente discrepância entre os níveis do mRNA e da atividade da enzima é no estriado, a região do cérebro onde AChE é mais abundante. Ao descobrir o clone de cDNA para *ache* de rato, Legay e colaboradores (1993) observaram que o estriado era relativamente pobre em mRNA para *ache* conforme avaliado por Northern blotting. No entanto, sugere-se que o baixo nível geral do mRNA para *ache* estriatal pode envolver a escassez dos neurônios expressarem na transcrição, e isto pode explicar a mudança no estriado, após a administração de L-tirosina.

O efeito da administração de L-tirosina no hipocampo não é conhecido. Mas acredita-se que a abundância da atividade

da enzima seja semelhante à quantidade de mRNA da proteína, visto que o nível de mRNA para *ache* em várias regiões cerebrais podem refletir na atividade da enzima. A consequência fisiológica que poderia ocorrer nos nossos resultados, na administração aguda e crônica, é um mecanismo compensatório. Este mecanismo faz com que tenha uma sub-regulação da expressão do mRNA para *ache*, que por sua vez reflete na taxa de produção de AChE (Hammond et al., 1994).

Nossos resultados demonstraram um aumento na atividade da AChE em todas áreas do cérebro avaliada após a administração de L-tirosina. Sugerimos que pacientes tirosinemicos podem ser vulneráveis a níveis reduzidos de ACh na fenda sináptica causada pelo aumento da atividade da AChE, o que contribui para o comprometimento cognitivo progressivo e disfunções neurológica visto em pacientes afetados por tirosinemia tipo II.

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, não podemos afirmar se os altos níveis plasmáticos de tirosina ou de seus metabólitos que são os responsáveis pelo comprometimento do SNC, mas acreditamos que alterações no metabolismo energético, podem provocar anormalidades cerebrais, pelo déficit de ATP, e esses danos podem estar envolvido com a presença de estresse oxidativo. Desta forma sugerimos que a depleção de ATP pode estar associada com a diminuição dos níveis de BDNF e o aumento da atividade da AChE, bem como, o aumento da atividade da AChE pode estar envolvido com a diminuição nos níveis de BDNF conforme visto neste estudo, representado na figura 15.

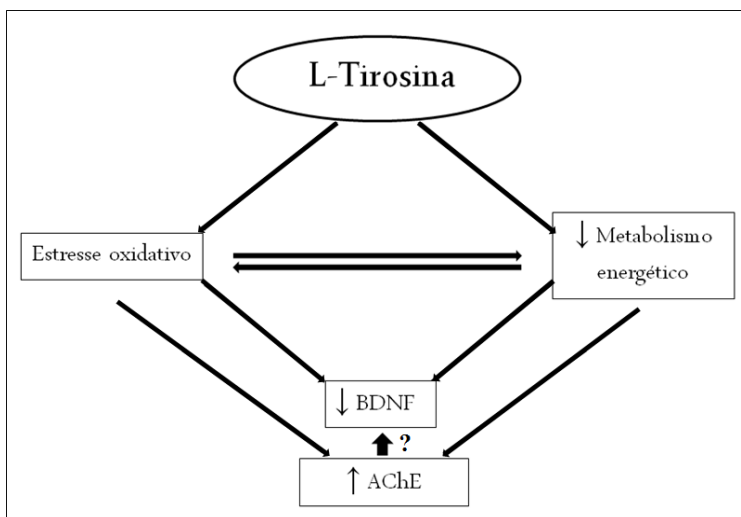


Figura 15: Representação esquemática dos resultados encontrados neste estudo e dados da literatura. A L-tirosina pode levar ao estresse oxidativo (Macêdo e colaboradores 2013; Sgaravatti e colaboradores 2008, 2009) e a diminuição do metabolismo energético, e esses por sua vez estão diretamente ligados por serem causa ou consequência de seus efeitos. O estresse oxidativo e a diminuição do metabolismo energético podem levar à diminuição dos níveis de BDNF, bem como o aumento da

atividade da enzima AChE. O aumento da atividade da AChE pode levar à diminuição dos níveis de BDNF.

7 PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho, confirmando nossos resultados e expandindo-os. Desta forma, nossas perspectivas são:

- Avaliar todos os parâmetros realizados neste trabalho em cerebelo de ratos submetidos a um modelo experimental de tirosinemia tipo II quimicamente induzido;
- Avaliar os níveis de BDNF e AChE por western-blotting em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de tirosinemia tipo II quimicamente induzido;
- Avaliar a integridade da barreira hematoencefálica em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de tirosinemia tipo II quimicamente induzido;
- Dosar a quantidade de L-tirosina bem como os metabólitos acumulados na tirosinemia tipo II quimicamente induzido, por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Dosar a quantidade dos neurotransmissores (dopamina, acetilcolina e glutamato) envolvidos na tirosinemia tipo II;
- Avaliar algumas proteínas da via de sinalização de morte celular em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de tirosinemia tipo II quimicamente induzido.
- Avaliar os parâmetros inflamatórios em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de tirosinemia tipo II quimicamente induzido.
- Avaliar novas propostas terapêuticas em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de tirosinemia tipo II quimicamente induzido.

REFERÊNCIAS

Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and nonelectron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7:1140-9.

Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*. 1998; 111:645-56.

Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*. 1990; 5:297-306.

Aldunate R, Casar JC, Brandan E. Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Rev*. 2004; 47:96-104.

Armstrong MD, Stave U. A study of plasma free amino acid levels: I. Study of factors affecting validity of amino acid analyses. *Metab Clin Exp*. 1973; 22:549.

Ballard CG, Greig NH, Guillozet-Bongaarts AL, Enz A, Darvesh S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res*. 2005; 2:307-18.

Barboza IG. Estudos da concentração plasmática de fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) em pacientes com transtorno bipolar do humor. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009; 89f.

Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res*. 1994; 390:45-6.

Baydyuk M, Russell T, Liao GY, Zang K, An JJ, Reichardt LF, Xu B. TrkB receptor controls striatal formation by regulating the number of newborn striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:1669-74.

Blass JP. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res*. 2001; 66:851-6.

Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab*. 2011; 104:2-9.

Boess FG, De Vry J, Erb C, Flessner T, Hendrix M, Luithle J. The novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist N-[(3R)-1-zabicyclo[2.2.2]oct-6-yl]-7-[2-(methoxy)phenyl]-1-benzofuran-2-carboxamide improves working and recognition memory in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 321:716-25.

Bongiovanni R, Yamamoto BK, Simpson C, Jaskiw GE. Pharmacokinetics of systemically administered tyrosine: a comparison of serum, brain tissue and in vivo microdialysate levels in the rat. *J Neurochem*. 2003; 87:310-7.

Brimijoin S, Hammond P. Transient expression of acetylcholinesterase messenger RNA and enzyme activity in developing rat thalamus studied by quantitative histochemistry and in situ hybridization. *Neuroscience*. 1996; 71:555-65.

Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida-Stella AM, Bates TE, Clark JB. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res*. 2001; 26:739-64.

Carbonell T, Rama R. Oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke. *Curr Med Chem*. 2007; 14:857-74.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory Action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 328:309-16.

Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC. Use of phenylalanine-to tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clin Chem*. 1998; 44:2405-9.

Charfeddine C, Monastiri K, Mokni M, Laadjimi A, Kaabachi N, Perin O, Nilges M, Kassas S, Keirallah M, Guediche M.N, Kamoun M.R, Tebib N, Ben Dridi M.F, Boubaker S, Osman AB, Abdelhak S. Clinical and mutational investigations of tyrosinemia type II in Northern Tunisia: Identification and structural characterization of two novel TAT mutations. *Molec Genet and Metab*. 2006; 184:191-88.

Charfeddine C, Monastiri K, Mokni M, Laadjimi A, Kaabachi N, Perin O, Nilges M, Kassas S, Keirallah M, Guediche MN, Kamoun MR, Tebib N, Ben Dridi MF, Boubaker S, Ben Osman A, Abdelhak S. Clinical and mutational investigations of tyrosinemia type II in Northern Tunisia: Identification and structural characterization of two novel TAT mutations. *Mol Genet Metab*. 2006; 88:184-91.

Chen H, Weber AJ. Brain-derived neurotrophic factor reduces Trk B protein and mRNA in normal retina and following optic nerve crush in rats brain. *Brain Res*. 2004; 1011:99-106.

Chen MH, Chen PR, Chen MH, Hsieh ST, Lin FHJ. Gelatin-tricalcium phosphate membranes immobilized with NGF, BDNF,

or IGF-1 for peripheral nerve repair: an in vitro and in vivo study. *Biomed Mater Res A*. 2006; 79:846-57.

Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, Mcewen BS, Hempstead BL, Lee FS. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*. 2006; 314:140-3.

Chitayat D, Balbul A, Hani V, Mamer OA, Clow C, Scriver CR. Hereditary tyrosinaemia type II in a consanguineous Ashkenazi Jewish family: intrafamilial variation in phenotype; absence of parental phenotype effects on the fetus. *J Inherit Metab Dis*. 1992. 15:198–203.

Colditz PB, Yu JS, Billson FA, Rogers M, Molloy HF, O'Halloran M, Wilcken B. Tyrosinaemia II. *Med J Aust*. 1984; 141:244.

Coufalik A, Monder C. Perinatal development of the tyrosine oxidizing system. *Biol Neonate*. 1978; 34:161.

Croll SD, Suri CD, Compton L, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity, and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience*. 1999; 93:1491-506.

Das A, Dikshit M, Nath C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci*. 2001; 68:1545-55.

de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra Filho CS, Wannmacher CM. Tyrosine inhibits creatine kinase activity in cerebral cortex of young rats. *Metab. Brain Dis*. 2011; 221:227-6.

de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM. Tyrosine impairs enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of rats. *Mol Cell Biochem.* 2012; 364:253-64.

Devlin TM, Michelacci YM. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas.* São Paulo: Edgard Blücher; 2003.

Dickinson CJ. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clinical Science.* 1996; 91:539-50.

Ellman GI, Courtney KD, Andres Jr.V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7:88-95.

Feigin RD, Klainer AS, Beisel WR. Factors affecting circadian periodicity of blood amino acids in man. *Metab Clin Exp.* 1968; 17:764.

Ferreira GK, Jeremias IC, Scaini G, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Furlanetto CB, Morais MO, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Effect of acute and chronic administration of L-tyrosine on nerve growth factor levels in rat brain. *Neurochem Res.* 2013; 38:1742-6.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153:23-6.

Fois A, Borgogni P, Cioni M, Molinelli M, Frezzotti R, Bardelli AM, Lasorella G, Barberi L, Durand P, DiRocco M, Romano C, Parini R, Corbetta C, Giovannini M, Riva E, Balato N, Sartorio R, Mollica F, Zammarchi E, Battini ML. Presentation of the data of the Italian registry for oculocutaneous tyrosinaemia. *J Inher Metab Dis.* 1986; 9:262-4.

Fraser NG, Macdonald J, Griffiths WA, Mcphie JL. Tyrosinaemia type II (Richner-Hanhart syndrome): Report of two cases treated with etretinate. *Clin Exp Dermatol*. 1987; 12:440.

Gaines JJ Jr. The pathology of alkaptonuric ochronosis. *Hum Pathol*. 1989; 20:40-6.

Garcia SC, Gonçalves CAS, Erdtmann B, Salvador M, Wyse ATS. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int*. 2009; 54:7-13.

García-Cazola A, Wolf IN, Serrano M, Moog U, Perez-Dueñas B, Poño P, Pineda M, Campistol J, Hoffmann GF. Mental retardation and inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis*. 2009; 32:599–608.

Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity dependent survival of cortical neurons. *Science*. 1994; 263:1618-23.

Giardini O, Cantani A, Kennaway NG, D' Eufemia P. Chronic tyrosinemia associated with without visceral and bone involvement. *Pediatric Res*. 1983; 27:25.

Gilbert EF. The effects of metabolic diseases on the cardiovascular system. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1987; 1:189-213.

Gokce O, Runne H, Kuhn A, Luthi-Carter R. Short-Term Striatal Gene Expression Responses to Brain-Derived Neurotrophic Factor Are Dependent on MEK and ERK Activation. *PLoS One*. 2009; 4:e5292.

Goldsmith LA, Laberge C : Tyrosinemia and related disorders, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 1989. p. 547.

Goldsmith LA. Alterações cutâneas em defeitos do metabolism dos aminoácidos: tirosinemia II, fenilcetonúria, acidúria argininossuccínica e alcaptonúria. In:Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. Fitzpatrick: tratado de dermatologia. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p. 1745-1756.

Goldsmith LA. Tyrosinemia and related disorders, in Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill; 1983. p. 287.

Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. Trends Pharmacol Sci. 2006; 27:482-91.

Granner DK, Hargrove JL. Regulation of the synthesis of tyrosine aminotransferase: The relationship to mRNATAT. Mol Cel Biochem. 1983; 53:113.

Greene RW, Nestler EJ. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101:10827-32.

Grifman M, Arbel A, Ginzberg D, Glick D, Elgavish S, Shaanan B, Soreq H. In vitro phosphorylation of acetylcholinesterase at non-consensus protein kinase A sites enhances the rate of acetylcholine hydrolysis. Brain Res Mol Brain Res, 1997; 51:179-87.

Gwag BJ, Koh JY, Chen MM, Dugan LL, Behrens MM, Lobner D, Choi DW. BDNF or IGF-I potentiates free radical-mediated injury in cortical cell cultures. Neuroreport. 1995; 7:93-6.

Hammond P, Rao R, Koenigsberger C, Brimujoin S. Regional variation in expression of acetylcholinesterase mRNA in adult rat

brain analyzed by in situ hybridization (cholinergic neuroanatomy/transcriptional regulation of acetylcholinesterase). *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91:10933-7.

Hanhart E. Neue sondersformen von keratosis palmoplantarius, u.a. eine regelmabig-dominant misystmatisierten lipomen, ferner 2 eihfach –rezessive mit schwachsinn und Z.T. Horautver and erungen des auges (ectodermal syndrom). *Dermatologica.* 1947; 94:286-308.

Hargrove JL, Mackin RB. Organ specificity of glucocorticoid-sensitive tyrosine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem.* 1984; 259:386.

Hargrove JL, Scoble HA, Mathews WR, Baumstark BR, Biemann K. The structure of tyrosine aminotransferase: Evidence for domains involved in catalysis and enzyme turnover. 1989; *J Biol Chem.* 264:45.

Hawkins RA, Mans AK, Biebuyck JF. Amino acid supply to individual cerebral structures in awake and anesthetized rats. *Am J Physiol.* 1982; 242:E1-E11.

Held PK. Disorders of tyrosine catabolism. *Mol Genetic Metab.* 2006; 88:103-6.

Herrero MB, Chatterjee S, Lefièvre L, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:522-36.

Horn D, Barrientos A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *Iubmb Life.* 2008; 421:429-60.

Huhn R, Stoermer H, Klingele B, Bausch E, Fois A, Farnetani M, Di Rocco M, Boue J, Kirk J.M, Coleman R, Scherer G. Novel

and recurrent tyrosine aminotransferase gene mutations in tyrosinemia type II. *Hum. Genet.* 1998; 102:305-13.

Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature.* 1991; 350:230-2.

Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr.* 2008; 30:243-5.

Kelly D, Gordon J, Alpers R, Strauss AW. The tissue-specific expression and developmental regulation of two nuclear genes encoding rat mitochondrial proteins. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial malate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1989; 264:18921-25.

Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2005; 1:334-7.

Kim EY, Hong YB, Go SH, Lee B, Jung SC. Downregulation of neurotrophic factors in the brain of a mouse model of Gaucher disease; implications for neuronal loss in Gaucher disease. *Exp Mol Med.* 2006; 38:348-56.

Kitto GB. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol.* 1969; XIII:106-16.

Koelle GB. Cholinesterases and anticholinesterase agents. In: Koelle, G.B. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer; 1963. p. 187-298.

Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science*. 1995; 268:573-5.

Kolling J, Scherer EB, Siebert C, Hansen F, Torres FV, Scaini G, Ferreira G, de Andrade RB, Gonçalves CA, Streck EL, Wannmacher CM, Wyse AT. Homocysteine induces energy imbalance in rat skeletal muscle: Is creatine a protector? *Cell Biochem Funct*. 2012; 31:575-84.

Krishna S, Andersson AM, Semsey S, Sneppen K. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34:2455-62.

Kubo T, Nonomura T, Enokido Y, Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res*. 1995; 85:249-58.

Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen species derivatives. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22:643-56.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001; 294:1945-8.

Legarda M, Wlodarczyk K, Lage S, Andrade F, Kim G, Bausch E, Scherer G, Aldamiz-Echevarria LJ. A large TAT deletion in a tyrosinaemia type II patient. *Molec Genet and Metab*. 2011; 407:409-104.

Legay C, Bon S, Vernier P, Coussen F, Massoulié J. Cloning and expression of a rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementarity with a Torpedo collagenic subunit. *J Neurochem*. 1993; 60:337-46.

Lemonnier F, Charpentier C, Odievre M, Larregue M, Lemonnier A. Tyrosine aminotransferase isoenzyme deficiency. *J Pediatr.* 1979; 94:931-32.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica.* 4ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol.* 2003; 69:341-74.

Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996; 19:289-317.

Light IJ, Sutherland JM, Berry HK. Clinical significance of tyrosinemia of prematurity. *Am J Dis Child.* 1973; 125:243.

Lock EA, Gaskin P, Ellis MK, McLean Provan W, Robinson M, Smith LL, Prisbylla MP. Tissue distribution of 2-(2-nitro-4-trifluoromethyl-benzoyl)cyclohexane-1,3-dione (NTBC): Effect on enzymes involved in tyrosine catabolism and relevance to ocular toxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 141:439.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.

Macêdo LGRP, Carvalho-Silva M, Ferreira GK, Vieira JS, Olegário N, Gonçalves RC, Vuolo FS, Ferreira GC, Schuck PF, Dal-Pizzol F, Streck EL. Effect of acute administration of L-tyrosine on oxidative stress parameters in brain of young rats. *Neurochem Res.* 2013 [Epub ahead of print].

Macasai MS, Schwartz TL, Hinkle D, Hummel MB, Mulhern MG, Rootman D. Tyrosinemia type II: nine cases of ocular signs and symptoms. *Am J Ophthalmol*. 2001; 132:522-7.

Malberg JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Rev Psychiatr Neurosci*. 2004; 196:205-29.

Mamunes P, Prince PE, Thornton NH, Hunt PA, Hitchcock ES. Intellectual deficits after transient tyrosinemia in the term neonate. *Pediatrics*. 1976; 57:675.

Marco R, Pestaña A, Sebastian J, Sols A. Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. *Mol Cell Biochem*. 1974; 3:53-70.

Mark GP, Shabani S, Dobbs LK, Hansen ST. Cholinergic modulation of mesolimbic dopamine function and reward. *Physiol Behav*. 2011; 104:76-81.

Martin GJ, Hueper WC. Biochemical lesions produced by diets high in tyrosine. *Arch Biochem Biophys*. 1942; 1:435.

Matté C, Pereira LO, Dos Santos TM, Mackedanz V, Cunha AA, Netto CA, Wyse AT. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity: prevention by folic acid treatment. *Neuroscience*. 2009; 163:1039-45.

Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreazza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem int*. 2009; 54:7-13.

Meissner T, Betz RC, Pasternack SM, Eigelshoven S, Ruzicka T, Kruse R, Laitenberger G, Mayatepek E. Richnere Hanhart syndrome detected by expanded newborn screening. *Pediatr Dermatol.* 2008; 25:378-80.

Melo JB, Agostinho P, Oliveira CR. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci Res.* 2003; 45:117-27.

Menkes JH, Welcher DW, Levi HS, Dallas J, Gretskey NE. Relationship of elevated blood tyrosine to the ultimate intellectual performance of premature infants. *Pediatrics.* 1972; 49:218-24.

Milatovic D, Dettbarn WD. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 136:20-8.

Mistretta CH M, Bradley RM. Effects of early sensory experience on brain and Behavioral development. *Studies on the development of behavior and nervous system.* New York: Academic Press; 1978. p. 215-246.

Mitchell GA, Lambert M, Tanguay RM. Hypertyrosinemia. In: Scriver CR, Beader AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 1995. p. 7-1077.

Mitchell GA, Grompe M, Lambert M, Tanguay RM. Hypertyrosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8a ed. New York: Mc Graw-Hill; 2001. p. 1977-82.

Mitchell GA, Grompe M, Lambert M, Tanguay RM. Hypertyrosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: Mc Graw-Hill, 2013. p. 1977-82.

Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, Meuth S, Nagy Greene RW, Nestler EJ. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:10827-32.

Morelli A, Ravera S, Panfoli I. Hypothesis of an energetic function for myelin. *Cell Biochem Biophys*. 2011; 61:179-87.

Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino JD, Tonkiss J, Galler JR. Malnutrition and the developing central nervous system. In: Isaacson, R.L., Jensen, K.F. (Eds.), *The Vulnerable Brain: Nutrition and Toxins*. New York: Plenum Publishing Corporation; 1992. p. 3-44.

Morre MC, Hefti F, Wurtman RJ. Regional tyrosine levels in rat brain after tyrosine administration. *J Neural Transm*. 1980; 49:45–50.

Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res*. 2005; 53:129-39.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001; 63:71-124.

Nakamura K, Tanaka Y, Mitsubuchi H, Endo F. Animal models of tyrosinemia. *J Nutr*. 2007; 137:1557–60.

Natt E, Kao F.T, Rettenmeier R, Scherer G. Assignment of the human tyrosine aminotransferase gene to chromosome 16. *Hum Genet*. 1986; 72:225-8.

Natt E, Westphal EM, Toth-Fejel SE, Magenis RE, Buist NR, Rettenmeier R, Scherer G. Inherited and de novo deletion of the

tyrosine aminotransferase gene locus at 16q22.1q22.3 in a patient with tyrosinemia type II. *Hum Genet.* 1987; 77:352.

Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. *Fronti Biosci* 2007; 12:1154-63.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier; 2006. p.1202.

Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci.* 2005; 8:1445-9.

Nonomura T, Kubo T, Oka T, Shimoke K, Yamada M, Enokido Y, Hatanaka H. Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996; 97:42–50.

Ohisalo JJ, Laskowska-Klita T, Andersson SM. Development of tyrosine aminotransferase and p –hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activities in fetal and neonatal human liver. *J Clin Invest.* 1982; 70:198.

Paige DG, Clayton P, Bowron A, Harper JJ. Richner-Hanhart syndrome (oculocutaneous tyrosinaemia type II). *J R Soc Med.* 1992; 85:759-760.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhens S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 2004; 306:487-91.

Phornphutkul C, Introne WJ, Perry MB, Bernardini I, Murphey MD, Fitzpatrick DL, Anderson PD, Huizing M, Anikster Y, Gerber LH, Gahl WA. Natural history of alkaptonuria. *N Engl J Med.* 2002; 347:2111-21.

Pugazhenth S, Phansalkar K, Audesirk G, West A, Cabell L. Differential regulation of c-jun and CREB by acrolein and 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40:21-34.

Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A, McNamara J. *Neuroscience*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 2001.

Qian L, Zhao J, Shai Y, Zhao X, Feng G, Xu F, Zhu S, He L. Brain-derived neurotrophic factor and risk of schizophrenia: an association study and meta-analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 353:738-43.

Rabinowitz LG, Williams RL, Anderson CE, Mazur A, Kaplan P. Painful keratoderma and photophobia: hallmarks of tyrosinemia type II. *J Pediatr*. 1995; 126:266-9.

Ramos AC, Ferreira GK, Carvalho-Silva M, Furlanetto CB, Gonçalves CL, Ferreira GC, Schuck PF, Streck EL. Acute administration of l-tyrosine alters energetic metabolism of hippocampus and striatum of infant rats. *Int J Dev Neurosci*. 2013; 31:303-7.

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol*. 2006; 361:1545-64.

Reichel A, Begley DJ, Ermisch A. Arginine vasopressin reduces the blood-brain transfer of l-tyrosine and l-valine: further evidence of the effect of the peptide on the l-system transporter at the blood-brain barrier. *Brain Res*. 1996; 713:232-9.

Rettenmeier R, Natt E, Hanswalter Z, Scherer G. Isolation and characterization of the human tyrosine aminotransferase gene. *Nucl Acids Res*. 1990; 18:3853.

Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res*. 2008; 34:1021-29.

Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res.* 2008; 33:114-24.

Rice DN, Houston IB, Lyon IC, Macarthur BA, Mullins PR, Veale AM, Guthrie R. Transient neonatal tyrosinaemia. *J Inher Metab Dis.* 1989; 12:13.

Richner H. Hornhautaffektion bei keratoderma palmar et plantare hereditariu. *Klin Monas bigenheil.* 1938; 100:580-8.

Rigante D, Gasbarrini A, Nista EC, Candelli M. Decreased mitochondrial oxidative capacity in hereditary tyrosinemia type 1. *Scand J Gastroenterol.* 2005; 40:612-3.

Rumajogee P, Vergé D, Haunon N, Brisorgueil MJ, Hen R, Lesch KP, Hamon M, Miquel MC. Adaption of the serotonergic neuronal phenotype in the absent of 5-HT auto receptors or the 5-HT transporter: involvement of BDNF and cAMP. *Eur J Neurosci.* 2004; 19:937-44.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Ge´rard B, Ro¨tig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994; 228:35-51.

Salgado H, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Millan-Zarate D, Diaz-Peredo E, Sanchez-Solano F, Perez-Rueda E, Bonavides-Martinez C, Collado-Vides J, Regulon DB. RegulonDB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:72-4.

Sayar RB, Von Domurus D, Schäfer HJ, Beckenkamo G. Clinical picture and problems of keratoplasty in Richner-Hanhart syndrome (tyrosinemia type II). *Ophthalmologica.* 1988; 197:1-6.

Scaini G, de Rochi N, Jeremias IC, Deroza PF, Zugno AI, Pereira TC, Oliveira GM, Kist LW, Bogo MR, Schuck PF, Ferreira GC, Streck EL. Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of maple syrup urine disease. *Mol Neurobiol.* 2012. 45:279-86.

Schlump JU, Ketteler PK, Schiff M, Mayatepek E, Wendel U, Spiekerkoetter U. Severe neurological crisis in a patient with hereditary tyrosinemia type I after interruption of NTBC treatment. *JIMD Short Report.* 2008; 109:126.

Schurr A. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochem Int.* 2002; 41:1-8.

Scott CR. The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006; 142:121-6

Scriver CR, Rosenberg LE. *Amino Acid Metabolism and Its Disorders.* Philadelphia: WB Saunders, 1973.

Sener RN. Brain magnetic resonance imaging in tyrosinemia. *Acta Radiol.* 2005; 46:618-20.

Sgaravatti AM, Magnusson AS, de Oliveira AS, Rosa AP, Mescka CP, Zanin FR, Pederzoli CD, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS. Tyrosine administration decreases glutathione and stimulates lipid and protein oxidation in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis.* 2009; 24:415-425.

Sgaravatti AM, Vargas BA, Zandoná BR, Deckmann KB, Rockenback FJ, Moraes TB, Monserrat JM, Sgarbi MB, Pederzoli CD, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Wajner M, Dutra-Filho CS. Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci.* 2008; 26:553-9.

Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1969; 114:597-610.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry.* 2003; 54:70-5.

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T. Modulation on synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 2005; 25:11194-200.

Shinomiya T, Scherer G, Schmid W, Zentgraf H, Schutz G. Isolation and characterization of the rat tyrosine aminotransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81:1346-1984.

Shrimpton AE, Braddock BR, Thomson LL, Stein CK, Hoo JJ. Molecular delineation of deletions on 2q37.3 in three cases with an Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Clin Genet.* 2004; 66:537-44.

Slotkin TA, Oliver CA, Seidler FJ. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005; 157:172-80.

Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* 1994; 77:627-38.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2:294-302.

Stoerner JW, Butler IJ, Morriss FH Jr, Howell RR Jr, Seifert WE Jr, Caprioli RM, Adcock EW, Denson SE. CSF neurotransmitter studies. An infant with ascorbic acid-responsive tyrosinemia. *Am J Dis Child*. 1980; 134:492–4.

Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Age Dev*. 2001; 122:1961-9.

Taylor P, Brown JH. Acetylcholine. In: Siegel GJ, Albers RW, Agranoff BW (eds). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*; 1994. p. 231-59.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*. 2005; 25:5455–63.

Tōugu V, Kesvatera T. Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1298:12-30.

Tyler D. *The Mitochondrion in Health and Diseases*. New York: VCH Publishers; 1992.

Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem*. 2002; 9:224-37.

Uylings HB. Development of the cerebral cortex in rodents and man. *Eur J Morphol*. 2000; 38:309-12.

Valikhani M, Akhyani M, Jafari AK, Barzegari M, Toosi S. Oculocutaneous tyrosinaemia or tyrosinaemia type 2: a case report. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005; 20:591–94.

Wong J. Neurotrophin signaling and Alzheimer's disease neurodegeneration: Focus on BDNF/Trk B signaling. Trends in cell signaling pathways in neuronal in fate decision. 2013.

Wong PWK, Lambert AM, Komrower GM. Tyrosinemia and tyrosyluria in infancy. Dev Med Child Neurol. 1967; 9:551.

Wu K, Xu JL, Suen PC, Levine E, Huang YY, Mount HT, Lin SY, Black IB. Functional TrkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. Mol Brain Res. 1996; 43:286-90.

Zhang Y, Zhao J, Wang J, Jio X. Brain-derived neurotrophic factor inhibits phenylalanine-induced neuronal apoptosis by preventing RhoA pathway activation. Neurochem Res. 2010; 35:480-6.

Zou J, Crews F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. Cell Mol Neurobiol. 2006; 26:385-405.

ANEXO



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



Resolução

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou as aulas práticas abaixo.

Protocolo: 42/2010

Professor:

Emílio Streck

Título: Investigação dos efeitos in vivo e in vitro da tirosina sobre parâmetros do metabolismo energético.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA.
www.unesc.net/propex/ceua.

Criciúma, 14 de setembro de 2010.

Carina Rodrigues Boeck

Coordenadora do CEUA